**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**

Caracterização molecular da Linhagem Pedra 2 de *Saccharomyces cerevisiae* sob condições de alto etanol em fermentadores industriais

Lucas Souza Lopes

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2015**

Lucas Souza Lopes
Bacharel em Ciências Biológicas

**Caracterização molecular da Linhagem Pedra 2 de *Saccharomyces cerevisiae*
sob condições de alto etanol em fermentadores industriais**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **MARCIO DE CASTRO SILVA FILHO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Lopes, Lucas Souza

Caracterização molecular da Linhagem Pedra 2 de *Saccharomyces cerevisiae* sob condições de alto etanol em fermentadores industriais / Lucas Souza Lopes . - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015. 133 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. *Saccharomyces cerevisiae* 2. Microarranjos de DNA 3. Fermentação de alto teor alcoólico 4. Linhagem Pedra 2 5. Estresse osmótico 6. Estresse oxidativo
I. Título

CDD 589.23
L864c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - O autor"

Com grande carinho e amor
As pessoas mais importantes da minha vida
Miguel e Maria José
Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Márcio de Castro Silva Filho pela oportunidade, confiança e orientação;

Ao Dr. Marcelo Mendes Brandão, pela inestimável colaboração e ensinamentos;

Ao Dr. Henrique Vianna Amorim pela importante contribuição na realização desse trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de Mestrado;

Aos meu pais (Miguel e Maria José) e meus irmãos (Vitor e Miguel), pelo apoio, dedicação e amor mesmo a distância;

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, Marcelo Brandão, Thais Souza, Wellington Campos, Elaine Castelhana, Flávia Franco, Larissa Spoladore, Renata Dias, Marcos Araújo, Horácio Montenegro, Aline Borges, Karina Lopes, Fabiana Mingossi e Poliene Costa;

Aos demais amigos de Piracicaba, em especial a Ivan, Ricchard, Natália e Juliana;

Ao técnico do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, Rafael Colombi, pela dedicação e organização do laboratório;

Aos amigos distantes, mas sempre presentes, Emília Muniz, Christiane Duarte, Iara Calil, Claudia Ramos, Luciana Salgado, dentre tantos outros;

Ao Daniel Prezotto Longatto por todo apoio nos momentos mais difíceis;

Aos meus familiares, em especial à minha avó Iracema Lopes, aos meus tios Maria das Graças, Felismino Araújo, Geraldo Magela e Glória que sempre me acolheram nas suas casas quando precisei;

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	17
LISTA DE SIGLAS	19
1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 Fungos Leveduriformes.....	23
2.1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
2.1.2 As Linhagens selvagens.....	25
2.1.3 A Linhagem Pedra 2.....	25
2.2 A produção de biocombustíveis no Brasil.....	26
2.2.1 O programa Próalcool	27
2.2.2 As tecnologias de produção de etanol	29
2.2.3 Fermentação de alto teor alcoólico	30
2.3 As diferentes condições de estresse impostas às leveduras	32
2.3.1 Etanol	33
2.3.2 Temperatura.....	34
2.3.3 Pressão Osmótica	35
2.3.4 Ácidos orgânicos e pH.....	36
2.3.5 Microrganismos contaminantes.....	37
2.4 Agentes indicadores de estresse em leveduras.....	39
2.4.1 Trealose	40
2.4.2 Glicogênio	41
2.4.3 Glicerol	41
2.5 Estudos de expressão gênica	42
2.5.1 Microarranjos de DNA	43
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
3.1 Informações gerais.....	47
3.2 Material biológico, ensaio fermentativo e confecção dos Microarranjos de DNA..	47
.....	47
3.3 Análises comparativas par a par	48
3.4 Análises de genes induzidos e reprimidos	48

3.4.1 Análise dos 5860 genes identificados.....	48
3.4.2 Identificação de vias metabólicas associadas à fermentação alcoólica	49
3.5 Construção de redes de correlação entre genes	50
3.5.1 Análise dos módulos gerados pela análise WGCNA	51
3.5.2 Análises comparativas dos módulos entre os experimentos par a par	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1 Análise dos genes induzidos com maiores valores de logFC	53
4.2 Identificação e análise de vias metabólicas e genes associados ao processo de fermentação industrial.....	55
4.3 Estudo das redes de correlação e módulos gerados pela análise WGCNA	72
4.4 Análises comparativas dos módulos entre os experimentos par a par	79
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
REFERÊNCIAS	87
ANEXOS.....	101

RESUMO

Caracterização molecular da Linhagem Pedra 2 de *Saccharomyces cerevisiae* sob condições de alto etanol em fermentadores industriais

A linhagem Pedra 2 (PE-2) de *Saccharomyces cerevisiae* destaca-se por ser o organismo mais comumente utilizado no processo industrial de produção de biocombustíveis. Com a descoberta das linhagens selvagens, alcançou-se uma maior tolerância ao etanol permitindo o desenvolvimento de uma nova tecnologia: a fermentação com alto teor alcoólico. Desta forma, foi possível aumentar tanto a concentração de açúcares totais do mosto quanto o volume final de etanol purificado. No entanto, esse novo processo de fermentação tem causado um agravamento nos diversos estresses aplicados à levedura. No presente trabalho, é apresentado o perfil transcricional da linhagem PE-2 sob condições de alto etanol em fermentadores industriais através da tecnologia de microarranjo de DNA. Com a utilização desta, analisou-se o perfil global da expressão da levedura, identificando grupos de genes de interesse e vias metabólicas correguladas no processo de adaptação e sobrevivência às diferentes condições de estresses impostas a levedura pela fermentação industrial. Mais especificamente, 5860 genes foram estudados nesse trabalho e tiveram as suas variações de expressão quantificadas ao longo dos tempos 0, 6, 12 e 18 horas do ciclo fermentativo industrial. Em particular, algumas vias metabólicas associadas a compostos-chave no processo fermentativo tiveram seus genes diferenciamamente expressos mapeados. Além disso, identificou-se vários grupos de genes altamente correlacionados a diferentes processos biológicos em *S. cerevisiae*, como por exemplo, a atividade de biossíntese de etanol. Por fim, espera-se que estes resultados forneçam bases para a realização de estudos mais direcionados no intuito de obter uma maior eficiência fermentativa e adaptação a estresses gerados durante o processo industrial.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*; Microarranjos de DNA; Fermentação de alto teor alcoólico; Linhagem Pedra 2; Estresse Osmótico; Estresse Oxidativo

ABSTRACT

Molecular characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Pedra-2 strain under high ethanol conditions in industrial fermentators

The Pedra-2 (PE-2) strain of *Saccharomyces cerevisiae* is commonly used in the industrial process for biofuel production. In studies of wild type strains of *S. cerevisiae*, a wider tolerance to ethanol was achieved, which allowed for the development of a new technology of high alcohol percentage fermentation. This process made possible the increase of total sugar concentration in the mixture, and the volume of purified ethanol, although the new process has caused increase in the stresses applied to the yeast. In this study, the transcriptional profile of the PE-2 strain in high ethanol conditions is presented using DNA microarray. The global expression profile was used to identify groups of genes of interest and to analyze metabolic pathways that became co-regulated in adaptation to stress conditions imposed to the yeast by the industrial fermentation. In particular, 5860 genes were studied in this work and were detailed according to their expression profiles belong the fermentation cycle (0, 6, 12 and 18 hours). Moreover, metabolic pathways associated to key compounds in the fermentative process were described in terms of the composition of the differentially expressed genes. In addition, groups of genes highly correlated to different biological process in *S. cerevisiae* were identified. Finally, it is expected that this work could provide new directions in the study of fermentative efficiency and induced stress adaptation during the industrial fermentative process.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; DNA microarray; high alcohol fermentation; Pedra-2 strain; osmotic stress; oxidative stress

LISTA DE FIGURAS

Figura1 - Principais agentes causadores de estresse em <i>S. cerevisiae</i> durante a fermentação alcoólica.....	33
Figura 2 – Equação de SimRel para cálculo de conexão entre <i>Gene Ontology</i> (GO) comparados numa rede de ontologia.....	51
Figura 3 – Valores percentuais de genes desconhecidos e associados a vias metabólicas de <i>S. cerevisiae</i> entre os 50 induzidos com maior valor de logFC para os experimentos Exp. 0.6, Exp. 0.12 e Exp. 0.18	53
Figura 4 – <i>Heatmap</i> obtido a partir da clusterização dos valores de logFC dos 154 genes identificados para os experimentos Exp. 0.6, Exp. 6.12 e Exp. 12.18	62
Figura 5 – Distribuição dos diferentes perfis de expressão obtidos no <i>heatmap</i> nas vias metabólicas levantadas nesse trabalho	62
Figura 6 - Mapeamento dos genes reprimidos e induzidos na Glicólise/Gliconeogênese	63
Figura 7 – Mapeamento dos genes reprimidos e induzidos na via do metabolismo de amido e sacarose	65
Figura 8 – Mapeamento dos genes induzidos e reprimidos na via do metabolismo de galactose	66
Figura 9 – Mapeamento dos genes induzidos e reprimidos na via do metabolismo de glicerolípídeos.....	68
Figura 10 – Mapeamento dos genes induzidos e reprimidos na via das pentoses fosfato ..	69
Figura 11 – Mapeamento dos genes induzidos e reprimidos na via do metabolismo de amino açúcares e nucleotídeo açúcares.....	70
Figura 12 – Mapeamento dos genes induzidos e reprimidos na via do metabolismo de frutose e manose.....	73
Figura 13 – Dendograma obtido a partir da " <i>Weighted Gene Co-expression Network Analysis</i> " (WGCNA) com os respectivos módulos identificados para o experimento Exp. 0.6	74
Figura 14 – Dendograma obtido a partir da " <i>Weighted Gene Co-expression Network Analysis</i> " (WGCNA) com os respectivos módulos identificados para o experimento Exp. 0.12.....	75
Figura 15 – Dendograma obtido a partir da " <i>Weighted Gene Co-expression Network Analysis</i> " (WGCNA) com os respectivos módulos identificados para o experimento Exp. 0.18.....	75
Figura 16 – Dendograma obtido a partir da " <i>Weighted Gene Co-expression Network Analysis</i> " (WGCNA) com os respectivos módulos identificados para o experimento Exp. 6.12.....	76

Figura 17 – Dendograma obtido a partir da " <i>Weighted Gene Co-expression Network Analysis</i> " (WGCNA) com os respectivos módulos identificados para o experimento Exp. 12.18	77
Figura 18 – Análise de enriquecimento de <i>Gene Ontology</i> (GO) para os diferentes módulos obtidos no experimento Exp. 0.6.....	77
Figura 19 – Análise de enriquecimento de <i>Gene Ontology</i> (GO) para os diferentes módulos obtidos no experimento Exp. 0.12.....	78
Figura 20 – Análise de enriquecimento de <i>Gene Ontology</i> (GO) para os diferentes módulos obtidos no experimento Exp. 0.18.....	77
Figura 21 – Análise de enriquecimento de <i>Gene Ontology</i> (GO) para os diferentes módulos obtidos no experimento Exp. 6.12.....	78
Figura 22 – Análise de enriquecimento de <i>Gene Ontology</i> (GO) para os diferentes módulos obtidos no experimento Exp. 12.18.....	79
Figura 23 – Dendograma obtido a partir da comparações dos diferentes módulos presentes nos experimentos Exp. 0.6, Exp. 6.12 e Exp. 12.18 (análise temporal).....	81
Figura 24 – Dendograma obtido a partir da comparações dos diferentes módulos presentes nos experimentos Exp. 0.6, Exp. 6.12 e Exp. 12.18 (análise que compara os diferentes tempos de coleta com 0 hora)	82
Figura 25 – Diagrama de Venn mostrando o número de genes comuns aos diferentes módulos presentes no <i>cluster A</i> (análise temporal).....	81
Figura 26 – Análise de enriquecimento de <i>Gene Ontology</i> (GO) para os diferentes módulos presentes no <i>cluster A</i> (análise temporal).....	83
Figura 27 – Diagrama de Venn mostrando o número de genes comuns aos diferentes módulos presentes no <i>cluster B</i> (análise temporal).....	83
Figura 28 – Análise de enriquecimento de <i>Gene Ontology</i> (GO) para os diferentes módulos presentes no <i>cluster B</i> (análise temporal).....	82
Figura 29 – Diagrama de Venn mostrando o número de genes comuns aos diferentes módulos presentes no <i>cluster A</i> (análise que compara os diferentes tempos de coleta com 0 hora)	83
Figura 30 – Análise de enriquecimento de <i>Gene Ontology</i> (GO) para os diferentes módulos presentes no <i>cluster A</i> (análise que compara os diferentes tempos de coleta com 0 hora)	83
Figura 31 – Diagrama de Venn mostrando o número de genes comuns aos diferentes módulos presentes no <i>cluster B</i> (análise que compara os diferentes tempos de coleta com 0 hora)	83

Figura 32 – Análise de enriquecimento de <i>Gene Ontology</i> (GO) para os diferentes módulos presentes no <i>cluster</i> B (análise que compara os diferentes tempos de coleta com 0 hora).....	84
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Compostos de referência utilizados nesse trabalhos com suas respectivas vias metabólicas.....	55
Tabela 2 – Os 15 genes induzidos com maiores valores de logFC para o experimento Exp. 0.6 dentre os 154 identificados nas vias metabólicas levantadas nesse trabalho	57
Tabela 3 – Os 15 genes induzidos com maiores valores de logFC para o experimento Exp. 0.12 dentre os 154 identificados nas vias metabólicas levantadas nesse trabalho	58
Tabela 4 – Os 15 genes induzidos com maiores valores de logFC para o experimento Exp. 0.18 dentre os 154 identificados nas vias metabólicas levantadas nesse trabalho	60
Tabela 5 – Percentuais de genes induzidos e reprimidos da via da Glicólise/Gliconeogênese presentes nos experimentos Exp. 0.6, Exp. 0.12, Exp. 0.18, Exp. 6.12 e Exp. 12.18	63
Tabela 6 – Percentuais de genes induzidos e reprimidos da via do metabolismo de amido e sacarose presentes nos experimentos Exp. 0.6, Exp. 0.12, Exp. 0.18, Exp. 6.12 e Exp. 12.18	65
Tabela 7 – Percentuais de genes induzidos e reprimidos da via do metabolismo de galactose presentes nos experimentos Exp. 0.6, Exp. 0.12, Exp. 0.18, Exp. 6.12 e Exp. 12.18	66
Tabela 8 – Percentuais de genes induzidos e reprimidos da via do metabolismo de glicerolípídeos presentes nos experimentos Exp. 0.6, Exp. 0.12, Exp. 0.18, Exp. 6.12 e Exp. 12.18	68
Tabela 9 – Percentuais de genes induzidos e reprimidos da via das pentoses fosfato presentes nos experimentos Exp. 0.6, Exp. 0.12, Exp. 0.18, Exp. 6.12 e Exp. 12.18	69
Tabela 10 – Percentuais de genes induzidos e reprimidos da via do metabolismo de amino açúcares e nucleotídeo açúcares presentes nos experimentos Exp. 0.6, Exp. 0.12, Exp. 0.18, Exp. 6.12 e Exp. 12.18.....	71
Tabela 11 – Percentuais de genes induzidos e reprimidos da via do metabolismo de frutose e manose presentes nos experimentos Exp. 0.6, Exp. 0.12, Exp. 0.18, Exp. 6.12 e Exp. 12.18	73

LISTA DE SIGLAS

cDNA – DNA complementar
EST – *Expression Sequence Target*
GO – *Gene Ontology*
GORilla – *Gene Ontology enrichment analysis and visualization tool*
IPVA – Imposto sobre a propriedade de veículos automotores
KEGG – *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*
logFC – logaritmo de *Fold Change*
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MIAME – Informações mínimas sobre um experimento de microarranjo
MPSS – *Massively Parallel Signature Sequencing*
ORF – *Open Reading Frame*
PE-2 – Linhagem Pedra 2 de *Saccharomyces cerevisiae*
REVIGO – *Reduce Visualize Gene Ontology*
RNA-Seq – Sequenciamento de RNA
SAGE – *Serial Analysis of Gene Expression*
SGD – *Saccharomyces Genome Database*
UNICA – União da Indústria de cana-de-açúcar
VHG – *Very High Gravity*
WGCNA – *Weighted Gene Co-expression Network Analysis*

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor de etanol no mundo, perdendo apenas para os Estados Unidos. Essa posição de destaque no cenário internacional tem levado o governo brasileiro a investir cada vez mais no setor sucroenergético e energias renováveis. De acordo com a União da Indústria de cana-de-açúcar (UNICA) (2014), o Brasil produziu nas safras de 2013/14 cerca de 26,52 bilhões de litros de etanol gerando uma receita de 18,52 bilhões de dólares para as destilarias brasileiras. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (2014) estima que até o ano de 2019 o Brasil será capaz de produzir 58,8 bilhões de litros desse biocombustível, sendo 50 bilhões para o mercado interno e 8,8 bilhões para exportação. Além disso, existe uma enorme importância energética associada a produção da bioeletricidade a partir do bagaço da cana (AMORIM; GRYSCHK; LOPES, 2010). A produção do etanol como combustível sustentável também merece destaque por promover enormes ganhos ambientais como a redução da emissão de gases estufa e alta eficiência de captação e fixação de CO₂ do ambiente pela cana em si (AMORIM; GRYSCHK; LOPES, 2010). Nenhuma outra tecnologia disponível atualmente é capaz de captar energia solar, reduzir a emissão de carbono na atmosfera e ao mesmo tempo alcançar alta eficiência e viabilidade econômica como a produção de etanol a partir da cana de açúcar para uso como combustível (AMORIM; GRYSCHK; LOPES, 2010).

Diante de todas essas perspectivas, várias tecnologias têm sido testadas com o intuito de aumentar a produção de etanol no Brasil. Uma das mais interessantes é a fermentação com alto teor alcoólico, acrônimo do inglês “*Very High Gravity Fermentation*” (VHG). Nesta, busca-se utilizar mostos com maiores concentrações de açúcares totais para aumentar os teores finais de etanol produzidos (LI et al., 2009). Dentre as vantagens dessa tecnologia destaca-se a redução dos volumes de água utilizados no processo de destilação, menor contaminação microbiológica (esterilização gerada pelo aumento dos teores de etanol no meio) e o ganho econômico, consequência direta de uma maior produção final de etanol por ciclo.

Contudo, ainda existem algumas barreiras a serem vencidas para a implementação em larga escala desta tecnologia no Brasil. A principal é a tolerância das leveduras utilizadas atualmente. Apesar desses microrganismos apresentarem

adaptações a estresses comumente causados em processos de fermentações industriais, a fermentação com alto teor alcoólico aumenta consideravelmente a intensidade destes, principalmente, os relacionados a alterações nas condições de equilíbrio osmótico e oxidativo (PIDDOCKE et al., 2009; PEREIRA et al., 2011).

Um fator adicional a essa limitação é a prática de reciclo de células. Ao final de cada ciclo fermentativo é comum a centrifugação de parte da biomassa disponível na dorna seguida de uma lavagem ácida. Após esses procedimentos, o material é então utilizado como inóculo numa etapa seguinte. Apesar de evitar a necessidade de um inóculo novo a cada processo, essa prática contribui para o agravamento de estresses impostos as leveduras causando, principalmente, a redução da viabilidade celular (BASSO et al., 2008). Tais limitações reforçam a necessidade de linhagens de leveduras mais adaptadas as condições de alto etanol e capazes de tolerar essas variações particulares de estresse da fermentação VHG.

Por fim, uma estratégia complementar a busca de novas linhagens adaptadas às condições de alto teor alcoólico seria a elucidação dos processos moleculares envolvidos na resposta do microrganismo as diferentes formas de estresse (BASSO et al., 2008). Nesse sentido, ferramentas que busquem identificar as alterações transcricionais da levedura ao longo do ciclo fermentativo industrial seriam capazes de fornecer informações importantes como grupos de genes e vias metabólicas correguladas envolvidas nos processos de adaptação, sobrevivência e respostas do microrganismo. Essas informações permitiriam o desenvolvimento de pesquisas mais direcionadas e, numa etapa seguinte, o planejamento de estratégias mais concretas para aumentar a eficiência fermentativa da levedura sob condições VHG no Brasil.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fungos Leveduriformes

As leveduras são microrganismos unicelulares amplamente distribuídos na natureza (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997). Apresentam estrutura eucariótica clássica com parede celular, membrana plasmática, citoplasma constituído por organelas membranosas e núcleo (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997). Dentre os fungos leveduriformes destacam-se as diferentes linhagens da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, organismo comumente utilizado em processos industriais de produção de bebidas alcoólicas e etanol (ANDRIETTA; STECKELBERG; ANDRIETTA, 2006).

Esses fungos se reproduzem sexuada e assexuadamente. Uma das formas mais comuns de reprodução assexuada é a por brotamento. Nesta ocorre a formação de uma protuberância externa na célula-mãe seguida de uma divisão nuclear. No final há o desprendimento do broto após a migração do núcleo para a região de formação da célula-filha (TORTORA; FUNKE; CASE, 2008).

Quanto à forma de obtenção de energia, as leveduras são classificadas como organismos anaeróbicos facultativos, ou seja, conseguem obter energia química na forma de ATP na presença ou ausência de oxigênio (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997). No processo anaeróbico, as leveduras fermentam no citoplasma compostos como glicose e frutose produzindo metabólitos como etanol, CO₂ e glicerol (ANDRIETTA; STECKELBERG; ANDRIETTA, 2006).

Ambientes que possuem pH levemente ácido, com diversas fontes de carbono, nitrogênio e água apresentam as condições mínimas essenciais para o crescimento e reprodução das leveduras (GUIMARÃES, 2005). Variações de temperatura, pressão osmótica e teores de etanol podem alterar o comportamento desses microrganismos devido ao surgimento de diversas fontes de estresse (WALKER, 1998). Assim, estudos envolvendo alterações no padrão de crescimento das leveduras quando submetidas a diferentes condições de estresse têm sido amplamente realizados com o intuito de aumentar a eficiência de utilização destes organismos em processos industriais como a fermentação VHG (PACHECO, 2010).

2.1.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Os microrganismos da espécie *S. cerevisiae* são alguns dos mais estudados no mundo. Mecanismos básicos dos eucariotos como divisão celular, duplicação do genoma e organelas, organização citoplasmática e nuclear tem sido aprofundados com esses fungos (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997; ALBERTS et al., 2010). Trabalhos aplicados à tecnologia fermentativa englobando fisiologia e bioquímica do microrganismo em condições industriais também tem sido amplamente realizados (BASSO et al., 2008).

No ano de 1996 o genoma da espécie *S. cerevisiae* foi sequenciado. Esse trabalho pioneiro desenvolvido por Goffeau et al. (1996) em parceria com mais de 600 pesquisadores foi um marco na ciência mundial por representar o primeiro sequenciamento completo do genoma de um eucarioto (GOFFEAU et al., 1996; OSTERGAARD; OLSSON; NIELSEN, 2000). Com a divulgação desse e de muitos outros trabalhos, diversos bancos de dados com informações sobre esse fungo foram criados, permitindo a comunidade científica ter acesso a uma grande quantidade de dados sobre a estrutura genética desse microrganismo (GOFFEAU et al., 1996; OSTERGAARD; OLSSON; NIELSEN, 2000).

O ciclo de vida de *S. cerevisiae* é constituído tanto por uma etapa sexuada como por uma assexuada. Partindo de uma célula inicial diplóide, a ocorrência de uma indução natural de meiose levará a formação de quatro esporos haplóides que ficam retidos no interior de uma estrutura denominada asco. O simples rompimento dos ascos permite a dispersão dos esporos no meio ambiente (ESPOSITO et al., 1981).

Em Linhagens heterotáticas é comum a ocorrência de uma extensão da haplófase, na qual vários esporos podem ser formados por sucessivas mitoses. Quando esporos de diferentes reações sexuais (*mating type*) se encontram ocorre a formação de híbridos diplóides, dando origem a fase conhecida como diplófase. As células diplóides podem tanto se multiplicar por sucessivas mitoses como ser induzidas a uma nova meiose, formando esporos haplóides retidos novamente nos ascos. Vários trabalhos apontam que o processo de esporulação em *S. cerevisiae* acontece principalmente em resposta à condições de estresse como a falta de nutrientes essenciais no meio (ROMAN, 1981).

2.1.2 As Linhagens selvagens

No final da década de 1980, várias linhagens de *S. cerevisiae* lançadas no mercado eram o resultado de modificações em laboratório com o intuito de aumentar a eficiência em processos fermentativos industriais (RODRIGUES; ANDRIETTA, 1995). No entanto, análises microbiológicas do caldo fermentado no final do ciclo industrial mostravam que esses organismos não sobreviviam ao processo fermentativo completo e que outras linhagens, ditas selvagens por naturalmente colonizarem e viverem em contato com a cana em seu ambiente natural, apresentavam maior resistência e adaptação ao processo mantendo-se viáveis inclusive após a reutilização dos inóculos em ciclos sucessivos (BASSO; OLIVEIRA; ORELLI, 1993; RODRIGUES; ANDRIETTA, 1995).

Com a descoberta das linhagens selvagens, uma nova estratégia passou a ser utilizada na década de 1990: identificar isolados de *S. cerevisiae* que apresentassem combinações de diversas características de interesse comercial. Dentre estas destacavam-se a alta eficiência fermentativa, alta capacidade de competição e sobrevivência no ambiente industrial (ANDRIETTA et al., 2007; BASSO et al., 2008). Dentre as muitas técnicas utilizadas na avaliação da permanência de leveduras contaminantes em dornas ao longo de vários ciclos, destaca-se a que utiliza a separação eletroforética do DNA cromossômico intacto (técnica de cariotipagem), a qual foi utilizada com sucesso em processos de diferenciação de gêneros, espécies e até mesmo linhagens de uma mesma espécie de levedura, incluindo *S. cerevisiae* (BASSO et al., 1993).

A indústria brasileira tem buscado a utilização de outros microrganismos para a produção de etanol. No entanto, as linhagens de *S. cerevisiae* tem sido as mais adequadas devido, principalmente, a natureza estressante do ambiente. Esses fungos apresentam maior adaptação, robustez e sobrevivência às diferentes condições de estresse comuns no ambiente industrial (ANDRIETTA et al., 2007; BASSO et al., 2008).

2.1.3 A Linhagem Pedra 2

A partir de meados da década de 1990, houve uma adoção generalizada por parte das destilarias brasileiras a linhagens selvagens e suas variantes obtidas pelas indústrias para a produção de etanol (BASSO et al., 1993; BASSO et al., 2003;

FERREIRA, 2008). Dentre as muitas escolhidas, a Pedra 2 (PE-2) tem se destacado principalmente por sua capacidade de tolerar os principais estresses industriais como alta produção de etanol, maior tolerância a diversos metabólicos tóxicos, estresse oxidativo e variações de temperaturas (PEREIRA et al., 2010; PEREIRA et al., 2011). A PE-2 é responsável pela produção de quase metade de todo o etanol brasileiro e cerca de 10% do etanol mundial (ARGUESO et al., 2009). A linhagem PE-2 foi identificada no início da década de 1990 através da técnica de separação de DNA cromossômico intacto por eletroforese também conhecida como técnica de cariotipagem (BASSO et al., 1993).

Atualmente vários trabalhos tem apontado que as linhagens híbridas são o caminho para unir as descobertas laboratoriais à aplicações em larga escala nas indústrias. O conjunto da obra deve apresentar melhorias em parâmetros como competição, sobrevivência e adaptação às condições de produção industrial em larga escala (ORTIZ-ZAMORA et al., 2009; HUUSKONEN et al., 2010; STANLEY et al., 2010).

2.2 A produção de biocombustíveis no Brasil

Nos últimos anos a ação antrópica tem causado significativas alterações climáticas no nosso planeta. Uma destas grandes intervenções é a emissão de gases estufa na atmosfera através da queima de combustíveis fósseis (ROCHA; BUCKERIDGE, 2009). Uma estratégia alternativa que vem emergindo em diversos países para minimizar os efeitos ambientais desses poluentes e ao mesmo tempo garantir o aumento da produção de energia é a utilização dos biocombustíveis (HAHN-HAGERDAL et al., 2006). Devido a característica renovável de produção desses compostos, a liberação de gases estufa no ambiente pode ser compensada por ciclos naturais como a fotossíntese (HALL, 1984; OHGREN et al., 2006).

Um dos principais biocombustíveis que se destacam no cenário econômico mundial é o etanol (CARDONA; SANCHEZ, 2007; AMORIM; GRYSCHK; LOPES, 2010). Produzido principalmente através da fermentação de açúcares do milho e da cana-de-açúcar, o etanol é uma solução vantajosa que alia aumento da produção de energia sem perder a sustentabilidade (ARGUESO et al., 2009; AMORIM; GRYSCHK; LOPES, 2010).

O etanol é utilizado em diversos setores do mercado brasileiro, movimentando bilhões de dólares na nossa economia (UNICA, 2014). Este pode ser utilizado como

solvente em indústrias químicas, desinfetantes na indústria de alimentos e componente na indústria farmacológica (ZANIN et al., 2000). O Brasil e os Estados Unidos detêm juntos a liderança absoluta de produção desse biocombustível (CHUM et al., 2014). Somente no mercado interno brasileiro no período de 2013/14 foram vendidos cerca de 26,52 bilhões de litros de etanol gerando uma receita aproximada de 18,52 bilhões de dólares para as destilarias brasileiras (UNICA, 2014). Os dados da UNICA também mostram que nos dois últimos anos foram produzidos 30,2 bilhões de litros de etanol no Brasil, um aumento de 48,8% em relação à produção de 2008/09 que ficou em torno de 20,3 bilhões. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estima uma produção de 58,8 bilhões de litros em 2019, sendo que 50 bilhões seriam para consumo interno e 8,8 bilhões para exportação.

O interesse econômico crescente nessa fonte de energia tem estimulado pesquisas que adequem a fermentação natural às condições industriais. Quesitos como aumento de produção de etanol, baixo custo dos substratos e menor poluição ambiental tem sido os principais pontos estudados (SIQUEIRA et al., 2008).

2.2.1 O programa Proálcool

A ideia de utilizar o etanol como combustível no Brasil não é recente. Em 1903 o primeiro Congresso Nacional em Aplicações Industriais de Álcool discutiu a possibilidade de gerar a infra-estrutura necessária para produção e utilização do etanol como combustível (MOREIRA; GOLDEMBERG, 1996). No entanto, somente na década de 1970 esse interesse ganhou destaque no cenário nacional com a crise internacional do petróleo (TAURINHO; FERREIRA; PIMENTEL, 1987). Nessa época o etanol passou a ser considerado como a solução mais viável para complementação ou até mesmo a substituição dos combustíveis fósseis (SERÔDIO, 1995).

O programa nacional de incentivo ao uso do Álcool (Próálcool) foi proposto ainda na década de 1970 como tentativa de abrandar a crise do petróleo (ZANIN et al., 2000). No entanto, seus efeitos atingiram outros setores da economia brasileira além do sucroenergético como a redução do déficit na balança comercial e estímulo de desenvolvimento de tecnologias de produção de outras fontes renováveis de energia (TAURINHO; FERREIRA; PIMENTEL, 1987). No momento da implementação do programa no ano de 1975, a produção etanol no Brasil era cerca

de 500 milhões de litros. Atualmente, esses valores ultrapassam 30,2 bilhões de litros (safras 2013/14) (ZANIN et al., 2000; MAPA, 2014).

A implementação do programa no Brasil foi feita em duas etapas. A primeira compreendeu os quatro primeiros anos do programa (1975-1979) na qual houve a adição gradual do etanol à gasolina. Os valores passaram de 1,1% em 1975 para 16,7% em 1979. Somente a partir de deste ano houve a utilização do etanol como combustível direto, sendo necessário para isso a reformulação dos motores dos veículos na época (ZANIN et al., 2000).

Veículos movidos a álcool eram os preferidos dos brasileiros até cerca de 1990. Após essa data, uma série de fatores levaram a perda de força da indústria sucroalcooleira no Brasil (ZANIN et al., 2000). Dentre os principais, destacaram-se o aumento gradativo do preço do etanol em relação ao da gasolina que passou de 64,5% em 1979 para mais de 80% em 1990 e o aumento dos preços de veículos movidos a álcool em decorrência da retirada dos incentivos fiscais no setor (MOREIRA; GOLDEMBERG, 1996). Essas mudanças econômicas levaram a uma diminuição da confiança do brasileiro no suprimento contínuo de etanol no Brasil manifestada numa queda acentuada no seu consumo como combustível direto para automóveis (MOREIRA; GOLDEMBERG, 1996).

Desta maneira a produção de veículos movidos a álcool foi reduzindo até o final da década de 1990 (ZANIN et al., 2000). Somente por volta do ano 2000 houve um novo aumento na produção desses veículos. As principais medidas adotadas para retomar a confiança dos brasileiros foram o retorno dos incentivos fiscais por parte do governo como a implementação de descontos no imposto sobre a propriedade de veículos automotores (IPVA) e o desenvolvimento da tecnologia de veículos movidos a ambos os combustíveis: etanol e gasolina (MOREIRA; GOLDEMBERG, 1996; UNICA, 2014).

A produção de bioetanol a partir da cana-de-açúcar é, atualmente, a maior tecnologia em larga escala capaz de produzir biocombustíveis de maneira eficiente sem perder viabilidade econômica. As combinações dos processos de fixação de CO₂ do ambiente pela cana através da fotossíntese e a fermentação alcoólica da biomassa sintetizada tem permitido a produção de combustíveis líquidos de alta qualidade com até 93% da energia original encontrada nos açúcares da planta (AMORIM et al., 2011).

2.2.2 As tecnologias de produção de etanol no Brasil

As tecnologias de produção de etanol no Brasil passaram por diversas modificações até chegar à metodologia utilizada atualmente. Apesar das adaptações realizadas em cada usina, é possível distinguir três processos básicos: batelada, batelada alimentada (Melle-Boinot) e contínua.

O processo de fermentação por batelada (clássico) foi utilizado até meados dos anos 1960 (MAIORELLA; BLANCH; WILKE, 1981). Nesse sistema, a maioria dos inóculos utilizados passavam por uma pré ativação em laboratório antes de serem adicionados ao mosto (MAIORELLA; BLANCH; WILKE, 1981). O fim da fermentação era determinado quando os teores de etanol nas dornas não sofriam mais alterações. Dentre os principais fatores responsáveis por essa queda do produção de etanol estavam a morte das leveduras, a falta de nutrientes essenciais no meio e o excesso de metabólitos inibitórios (MAIORELLA; BLANCH; WILKE, 1981). No final do ciclo o etanol era recuperado por vias destilatórias e antes de iniciar um novo processo a dorna passava por uma sanitização (MAIORELLA; BLANCH; WILKE, 1981). As principais críticas apontadas eram a lentidão do processo, a necessidade de limpeza das dornas a cada batelada e a necessidade de um novo inóculo a cada ciclo (MAIORELLA; BLANCH; WILKE, 1981).

Ainda nos anos 1960 uma nova tecnologia veio substituir o sistema clássico: a batelada alimentada, também conhecida como Melle-Boinot (MAIORELLA; BLANCH; WILKE, 1981). A principal característica desse processo é a alimentação contínua e crescente do sistema com mosto até ser atingido o limite de volume da dorna. Esse controle de adição é baseado nas concentrações de massa celular dos microrganismos presentes no meio e na taxa de consumo dos substratos fermentáveis, os quais deveriam ser mantidos em concentrações constantes (MAIORELLA; BLANCH; WILKE, 1981). Um grande diferencial apontado nesse processo em relação ao anterior é a utilização da lavagem ácida do inóculo para remoção de impurezas. Nesse sentido, após cada etapa, as células poderiam ser reutilizadas no ciclo seguinte. Essa tecnologia permitiu a eliminação da necessidade de ativação de um novo inóculo a cada batelada (MAIORELLA; BLANCH; WILKE, 1981).

A principal vantagem desse processo em relação ao anterior está na diminuição da complexidade de manuseio dos diferentes ciclos fermentativos. Além de não haver a necessidade de produzir novos inóculos a cada processo, houve

também um incremento de produção de etanol por ciclo e eliminação de diversos contaminantes com a adição da lavagem ácida (MAIORELLA; BLANCH; WILKE, 1981). Somente em meados da década de 1980 um novo processo (contínuo) passou a ser utilizado nas indústrias brasileiras.

O processo contínuo foi implementado em meados da década de 1980 e atingiu o seu auge na década de 1990 (ANDRIETIA; STUPIELLO, 1990). Este permitiu avanços significativos na redução dos custos de produção trazendo vantagens ainda maiores para a produção industrial em larga escala (ZARPELON; ANDRIETTA, 1992). O sistema contínuo é baseado na adição do mosto e retirada concomitante do caldo fermentado. Para que o sistema funcionasse várias dornas de diferentes volumes foram acopladas continuamente. A adição de inóculo também passou a ser empregada de forma contínua (ZARPELON; ANDRIETTA, 1992).

Diversos trabalhos apontaram vantagens desse processo em relação à batelada alimentada. A redução dos custos de produção, aumento dos teores de etanol purificado, diminuição dos custos com mão de obra, diminuição dos tempos considerados não produtivos (sanitização das dornas, carga e descarga do mosto) fizeram com que esse sistema se difundisse rapidamente pelas destilarias brasileiras (RODRIGUES; ANDRIETTA; MAUGERI, 1992; GUERREIRO, 1995). No entanto, esse processo também pontencializou problemas como o aumento de contaminantes no meio.

2.2.3 Fermentação de alto teor alcoólico

No final da década de 1980 uma nova tecnologia passou a ser discutida como uma alternativa vantajosa na produção de etanol (THOMAS; HYNES; INGLEDEW, 1996). Foi proposto que a utilização concomitante de linhagens mais adaptadas e tolerantes a diversas condições de estresse e mostos mais concentrados em açúcares totais (25% a 30% (m/v)), poderia levar a produção máxima de etanol a valores mais altos do que os obtidos no período (BAYROCK; INGLEDEW, 2001; LI et al., 2009). Nos Estados Unidos, que utilizam uma tecnologia diferente da brasileira baseada na fermentação de açúcares presentes no milho, é possível obter cerca de 18% de etanol (v/v) num tempo médio de 50 horas. A fermentação com alto teor alcoólico teria pontencial para alcançar estes valores percentuais em fermentações de aproximadamente 8 horas.

Além das vantagens econômicas a fermentação de alto teor alcoólico se destaca pelas vantagens ambientais através de significativa economia de água. Com a utilização de substratos mais concentrados, o consumo de água em processos destilatórios para recuperação do etanol e limpeza das dornas puderam ser reduzidos (THOMAS; HYNES; INGLEDEW, 1996). Além disso, essa tecnologia permitiu a obtenção de maiores teores de etanol a um menor investimento de recursos em mão de obra e assepsia (THOMAS; HYNES; INGLEDEW, 1996). Por fim, uma consequência vantajosa desse processo foi a redução de microrganismos contaminantes no sistema. O aumento dos teores de etanol no caldo fermentado levou a uma repressão natural de outros microrganismos, gerando um menor gasto de recursos no controle de contaminantes e consequentemente reduzindo ainda mais os valores de produção do etanol brasileiro (THOMAS; HYNES; INGLEDEW, 1996).

No entanto, ainda existe um fator limitante no processo. A fermentação de alto teor alcoólico causa o agravamento de diversos tipos de estresses nas leveduras. Mesmo com as adaptações ao sistema industrial, esses microrganismos produzem baixos teores de etanol quando submetidos a essa tecnologia em comparação aos ensaios preliminares em laboratório. As explicações para essas diferenças perpassam pela imposição de uma carga de estresse superior no ambiente industrial que apresenta contaminação microbiana significativa, variações drásticas de temperatura, reutilização de inóculos em ciclos sucessivos e alto estresse osmótico.

Diversos trabalhos tem buscado isolar linhagens de *S. cerevisiae* capazes de produzir altos teores de etanol quando na presença de maiores estresses oxidativos e osmóticos. Dentre as linhagens isoladas, a PE-2 vem se destacando devido a sua tolerância a elevados teores de etanol, robustez e manutenção da viabilidade celular mesmo com a reutilização de inóculos em vários ciclos seguidos (BASSO et al., 2003). No entanto, mesmo a PE-2 ainda tem mostrado sensibilidade à tecnologia de fermentação com alto teor alcoólico. Desta maneira, trabalhos que envolvam a elucidação dos mecanismos de tolerância aos principais estresses gerados pela fermentação de alto teor alcoólico em PE-2 poderiam resultar em avanços significativos no setor alcoleiro brasileiro (BASSO et al., 2003).

2.3 As diferentes condições de estresse impostas às leveduras

O contato com diversas condições de estresse é algo comum a todos seres vivos. Para evitar que essas alterações ambientais ou fisiológicas causem danos irreversíveis, é comum a ativação de uma série de estímulos moleculares e metabólicos pelos organismos (ESTRUCH, 2000; MENSONIDES et al., 2002).

Em organismos unicelulares, respostas às condições de estresse assumem singular importância devido ao ambiente altamente variável a que estão submetidos. As leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* não fogem a essa regra e tem sido amplamente utilizadas em estudos envolvendo respostas de eucariotos a estas condições. O alto grau de conservação das rotas de estresse no domínio Eukarya tem levado a adoção generalizada das leveduras como o modelo mais adequado para a elucidação de respostas em organismos mais complexos (ESTRUCH, 2000).

Além dos estudos de ciência básica nesse organismo modelo, as buscas por entendimentos em processos biológicos associados à respostas à variações ambientais possui grande interesse para a indústria fermentativa. O ambiente industrial se destaca como um dos maiores causadores de estresse em leveduras devido às condições particulares da fermentação com alto teor alcoólico. Alterações de temperatura, pressão osmótica e pH juntamente com escassez de nutrientes, excesso de sulfitos e etanol são apenas algumas das causas da queda de produção das leveduras nas indústrias brasileiras (BASSO et al., 2008). Além disso, alguns agentes causadores de estresse possuem efeitos sinérgicos, potencializando os danos causados sobre os microrganismos (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008; BASSO et al., 2008).

Na Figura 1 estão listados os principais agentes causadores de estresse sobre as leveduras no ambiente industrial (INGLEDEW, 1999). A elucidação dos mecanismos moleculares por trás destes poderá trazer ganhos concretos para a indústria brasileira de etanol, permitindo um aumento significativo de produção e ampliação do uso de fontes renováveis de energia tanto no Brasil como no mundo (BASSO et al., 2008).

Por fim, vários trabalhos apontam que a alteração da concentração de alguns compostos de membrana podem ser uma das principais formas de aumentar a tolerância ao etanol (INGRAM, 1976; JIMÉNEZ; BENÍTEZ, 1987). Aumentos nos teores de ácidos graxos insaturados e ergosterol em leveduras submetidas ao estresse etanólico resultaram numa maior capacidade de sobrevivência dessas

células (WALKER-CAPRIOGLIO; CASEY; PARKS, 1990; YOU; ROSENFELD; KNIPPLE, 2003; VANEGAS et al., 2012).

Figura 1 – Principais agentes causadores de estresse em *S. cerevisiae* durante o processo de fermentação industrial

Fonte: Extraído e adaptado de Bai; Anderson; Moo-Young, 2008.

2.3.1 Etanol

Apesar da tolerância a pequenas concentrações de etanol, as leveduras apresentam uma série de problemas fisiológicos que levam a redução da viabilidade celular quando os teores desse composto aumentam no meio (JONES, 1989; PIPER, 1995).

A membrana plasmática apresenta vital importância para as células devido a sua propriedade de barreira seletiva (INGRAM, 1976; JONES, 1989). Graças a isso, um equilíbrio intracelular que mantém as condições necessárias à vida pode ser mantido (ALBERTS et al., 2003). A presença de altos teores de etanol no mesmo ambiente de crescimento de organismos unicelulares causa uma série de distúrbios que culminam em alterações na polaridade e fluidez das membranas causando uma redução de suas propriedades seletivas (BANAT et al., 1998).

Devido a sua natureza química, o etanol apresenta alta afinidade com compostos apolares manifestada na sua capacidade de se inserir entre os ácidos graxos insaturados da bicamada lipídica reduzindo sua barreira hidrofóbica (INGRAM, 1976). Essas alterações causam a entrada de moléculas polares por pontos não passíveis de controle reposicionando muitas proteínas na membrana (INGRAM; BUTTKE, 1984; SALGUEIRO; SÁ-CORREA; NOVAIS, 1988). Todos

esses danos à integridade da membrana dificultam a manutenção do gradiente de concentração permitindo a passagem de diversos solutos e íons para o ambiente subcelular (INGRAM; BUTTKE, 1984; SALGUEIRO; SÁ-CORREA; NOVAIS, 1988).

A redução do potencial de membrana é outro problema que ocorre com o aumento dos teores de etanol no meio. Altas concentrações de etanol associados a temperaturas elevadas inibem a atividade de complexos ATPásicos prejudicando a manutenção do gradiente eletroquímico, a regulação do influxo e efluxo de prótons e a captação de diversos nutrientes essenciais para as células (LEÃO; van UDEN, 1984; PIPER, 1995).

Por fim, vários trabalhos apontam que a alteração da concentração de alguns compostos de membrana podem ser uma das principais formas de aumentar a tolerância ao etanol (INGRAM, 1976; JIMÉNEZ; BENÍTEZ, 1987). Aumentos nos teores de ácidos graxos insaturados e ergosterol, observados em células submetidas ao estresse etanólico, resultaram numa maior capacidade de sobrevivência desses microrganismos (WALKER-CAPRIOGLIO; CASEY; PARKS, 1990; YOU; ROSENFELD; KNIPPLE, 2003; VANEGAS et al., 2012).

2.3.2 Temperatura

A temperatura tem enorme importância no crescimento e sobrevivência de um microrganismo (JONES; HOUGH, 1970). Além de influenciar diretamente na taxa de crescimento das leveduras, processos básicos para a sobrevivência como atividade e eficiência enzimática são profundamente afetados por variações de temperatura (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997).

Vários estudos mostram que o estresse gerado por altos teores de etanol nas leveduras é agravado quando o sistema é submetido a altas temperaturas (PIPER, 1995; ALDIGUIER et al., 2004). Ambos atuam na membrana plasmática desnaturando proteínas e aumentando o influxo de prótons (ALDIGUIER et al., 2004). Trabalhos que conduziram fermentações em temperaturas superiores a 39°C observaram uma redução significativa na produção de etanol além de uma fermentação muito mais lenta do que as conduzidas em temperaturas próximas de 33°C (ALDIGUIER et al., 2004).

Várias são as consequências do estresse térmico em *S. cerevisiae*. Desidratação osmótica, exposição a agentes químicos e dificuldades na assimilação de nutrientes são apenas alguns exemplos (PIPER, 1993). Quando as leveduras são

submetidas a oscilações drásticas de temperaturas, observa-se um aumento do teor de proteínas de choque-térmico (hsps), acúmulo de trealose e dos níveis de ergosterol nas membranas (ATTFIELD, 1987; LINDQUIST; CRAIG, 1988). O peso somado dessas alterações são capazes de promover uma resistência relativa ao calor nas leveduras (PIPER, 1993).

Estudos que foquem no desenvolvimento de leveduras com tolerância as altas temperaturas são essenciais para a melhoria da tecnologia fermentativa brasileira. A maioria dos microrganismos utilizados atualmente não toleram temperaturas próximas aos 40°C. Através de técnicas de controle de calor no ambiente, principalmente associadas ao resfriamento das dornas, é possível evitar que o calor gerado durante a fermentação não cause problemas no crescimento das leveduras e consequente redução dos níveis de produção de etanol (ABDEL-BANAT et al., 2010).

Nesse sentido, o desenvolvimento de linhagens tolerantes as altas temperatura não só evitaria que esse estresse causasse danos às leveduras, como também promoveria uma significativa redução de custos em processos de resfriamento (FURLAN, 2012).

2.3.3 Pressão Osmótica

Com efeito direto sobre a membrana plasmática o estresse osmótico atua diretamente sobre o equilíbrio homeostático do organismo (JOHN et al., 2012). Ao entrarem em contato com um ambiente hiperosmótico, os microrganismos tendem a perder água para o meio levando a um processo de desidratação (MAGER; SIDERIUS, 2002). Dentre as várias medidas naturais de combate a esse estresse destacam-se o bloqueio do crescimento celular através da inibição das fases G1 e G2 do ciclo celular e o aumento dos níveis citoplasmáticos de glicerol (ALEXANDER et al., 2001; BELLÍ et al., 2001; MAGER; SIDERIUS, 2002).

A principal consequência do aumento da pressão osmótica sobre as leveduras é a diminuição da sua viabilidade celular (JOHN et al., 2012). Esse efeito pode ainda ser potencializado por altas temperaturas e altos teores de etanol, devido a ação sinérgica destes estresses sobre a membrana plasmáticas das células (JOHN et al., 2012). Uma medida compensatória bastante utilizada e apontada em diversos trabalhos é a adição no meio de diversas fontes nitrogenadas, ergosterol e óleos insaturados (CASEY; MAGNUS; INGLEDEW, 1984; THOMAS; HYNES;

INGLEDEW, 1994). Esses atuaram estimulando o crescimento microbiano, ampliando a captação de nutrientes essenciais e fortalecendo os mecanismos de respostas a estresse sobre a membrana plasmática (CASEY; MAGNUS; INGLEDEW, 1984; THOMAS; HYNES; INGLEDEW, 1994).

A capacidade de osmorregulação em *S. cerevisiae* está bastante elucidada (HOHMANN; KRANTZ; NORDLANDER, 2007; PARMAR; BHARTIYA; VENKATESH, 2011). Quando submetidas ao estresse, as leveduras respondem inicialmente com uma repressão do crescimento celular seguido do aumento dos níveis de Glicerol no citoplasma. O principal papel deste composto é a recuperação da pressão de turgor, que foi perdida em decorrência da liberação de água para o ambiente externo. O aumento dos teores de Glicerol é conseguido com a ativação da via HOG ("*High-osmolarity Glycerol*"), uma rota de resposta a estresse osmótico (ALEXANDER et al., 2001; BELLÍ et al., 2001; MAGER; SIDERIUS, 2002; HOHMANN; KRANTZ; NORDLANDER, 2007).

2.3.4 Ácidos orgânicos e pH

Uma das principais alterações subcelulares causadas pela presença de estresses é a acidificação citoplasmática (ATTFIELD, 1997). De maneira geral, a queda de pH é ocasionada pelo aumento do influxo de prótons (ERASO; GANCEDO, 1987). O principal mecanismo natural utilizado pelas células para evitar a ocorrência de danos subcelulares é o bombeamento contínuo dos íons H^+ para o ambiente extracelular via complexos ATPásicos de membrana (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008).

No Brasil é comum o desenvolvimento de fermentações em ambientes ácidos (BASSO; ALVES; AMORIM, 1996). Graças a tolerância a baixos índices de pH adquiridas pelas linhagens de leveduras atuais é possível a implementação da prática da lavagem ácida e reciclo do inóculo (BASSO; ALVES; AMORIM, 1996). Esses processos promovem a limpeza das células através do tratamento com ácidos objetivando eliminar impurezas e microrganismos contaminantes sem, no entanto, perder a viabilidade celular das leveduras (BASSO; ALVES; AMORIM, 1996).

Apesar do efeito estressante sobre a levedura somado ao gasto de energia para manutenção do pH intracelular, a presença de ambientes ácidos no processo fermentativo industrial apresenta uma série de vantagens (NARENDRANATH E POWER, 2005). A principal delas é a redução de microrganismos contaminantes no

mosto. Esses geralmente apresentam menor tolerância a ambientes ácidos que as leveduras e podem ser eliminados sem a necessidade de alocação de recursos (BASSO et al., 1996).

Outra solução interessante foi proposta por Huang et al. (2011). Em seus trabalhos propõe-se o aumento da pressão osmótica como agente de controle da contaminação bacteriana, eliminando a necessidade de manutenção de baixos valores de pH no mosto. Apesar de reduzir o efeito do estresse em decorrência da acidificação, a adesão dessa metodologia requer a utilização de leveduras que apresentem tolerância tanto a altos potenciais osmóticos quanto a prática de ciclos adotada pela indústria brasileira.

A alta concentração de ácidos orgânicos fracos no meio é uma das principais causas do gasto de energia na manutenção do pH intracelular nas leveduras. Em ambientes de baixo pH é comum a associação desses ácidos a íons H^+ facilitando a difusão dessas moléculas pela membrana das leveduras. No ambiente citoplasmático ocorre a dissociação e consequente aumento da acidez intracelular. Tanto os ácidos orgânicos fracos como os íons podem ser expelidos para o ambiente externo, mas com o gasto dispendioso de ATP (ORIJ; BRUL; SMITS, 2011).

O ácido succínico é um exemplo dos diversos ácidos orgânicos encontrados no caldo fermentado (Oura, 1977). Acredita-se que a sua formação esteja associada a biossíntese de glicerol, principal metabólito utilizado pelas leveduras para combater o estresse osmótico. Oura (1977) mostrou que a simples redução da produção deste ácido pelas leveduras leva a uma consequente queda de produção de glicerol e aumento na produção de etanol. Contudo, como mencionado anteriormente, apesar da redução na produção deste ácido levar a uma maior produção de etanol, projetos que busquem esses resultados também precisam considerar o aumento da sensibilidade do microrganismo a estresse osmótico, já que este ocasiona o agravamento do processo de desidratação das leveduras, principalmente no início do ciclo fermentativo.

2.3.5 Microrganismos contaminantes

A presença de uma microbiota contaminante é algo comum a qualquer ambiente não estéril (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997). Vários trabalhos já evidenciaram diversas espécies de bactérias e fungos presentes na cana-de-açúcar

desde o seu crescimento no campo até a chegada na indústria. Os microrganismos comumente encontrados nessa monocotiledônea costumam habitar o sistema vascular podendo adentrar no colmo caso ocorra danos físicos na planta (GALLO, 1989; ALQUATI, 1990). A contaminação por microrganismos é algo inegável na indústria fermentativa brasileira, no entanto dependendo das condições de assepsia utilizadas no transporte de substratos, manutenção de equipamentos e processos fermentativos é possível minimizar os seus efeitos (ALTHERTUM et al, 1984).

A maioria dos microrganismos encontrados no caldo fermentativo são oriundos de contaminações no processo de moagem das plantas (GALLO, 1989; ALQUATI, 1990). Falta de cuidados assépticos nas diversas etapas deste processo bem como no transporte e entrega do produto levam a aumentos significativos de organismos contaminantes (ALTHERTUM et al, 1984). Alguns trabalhos também apontam como fontes de contaminação, a falta de manutenção das tubulações das usinas e a qualidade da água utilizada no processo de lavagem das dornas e destilação do etanol (BOVI; MARQUES, 1983).

Dentre os gêneros de bactérias mais comuns de serem encontrados na cana-de-açúcar destacam-se *Flavobacterium*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Leuconostoc*, *Bacillus* e *Corynebacterium*. Os fungos colonizadores mais comuns dessa monocotiledônea são os pertencentes aos gêneros *Candida*, *Saccharomyces*, *Torula* e *Pichia* (GALLO, 1989).

A principal consequência da presença de diversos microrganismos contaminantes é a redução da eficiência fermentativa acompanhada de uma menor produção de etanol (LUDWIG; OLIVA-NETO; ANGELIS, 2001). Ademais, a liberação de diversos metabólitos tóxicos para a levedura, o consumo de nutrientes presentes no meio (açúcares, compostos nitrogenados, etc) e a indução de floculação das leveduras pelas bactérias fazem deste um dos principais problemas da indústria sucroalcooleira brasileira (LUDWIG; OLIVA-NETO; ANGELIS, 2001).

Mesmo diante desses diversos problemas, pouco se tem estudado sobre a diversidade de leveduras contaminantes no ambiente industrial. Apesar de alguns trabalhos buscarem isolados selvagens competitivos com as melhores linhagens presentes no mercado, a presença de diferentes grupos de leveduras no mosto normalmente resulta em fermentações mais lentas causando atrasos logísticos tanto na dinâmica do processo fermentativo em si, como na programação da colheita em geral (CECCATO-ANTONINI; SILVA, 1998). Além disso, essas leveduras

contaminantes causam um efeito negativo extra sobre o processo de reciclo de células, visto que, as linhagens selvagens são altamente competitivas e se tornam predominantes na comunidade celular do caldo fermentado no final do ciclo (CECCATO-ANTONINI; SILVA, 1998).

Os gêneros mais comuns de leveduras presentes no mosto são: *Saccharomyces*, *Pichia* e *Candida*. A nível específico já foram encontrados indivíduos de *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, *S. chevalieri*, *Candida krusei*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *Pichia membranaefaciens*. Outras trabalhos que focaram na identificação de espécies contaminantes também citam *Candida diddensiae*, *C. fabianii*, *C. intermedia*, *C. santamariae*, *Cryptococcus kuetzingii*, *Hansenula polymorpha*, *Kloeckera corticis*, *Rhodotorula pallida*, *R. rubra*, *S. uvarum*, *Torulopsis norvegica* e *Trichosporon cutaneum*, *Hansenula anômala* e *Saccharomyces kluyveri* como leveduras contaminantes presentes na indústria fermentativa (NEDER, 1957; LIMA et al., 1974; CASTRO, 1995).

Dentre as principais medidas a serem adotadas para redução de contaminantes na indústria destacam-se a utilização de linhagens mais competitivas com as selvagens, maior controle asséptico dos processos de colheita, transporte e moagem da cana, manutenção da infra-estrutura industrial, busca de um maior rigor de qualidade da água utilizada e melhor controle de fatores abióticos que propiciam o crescimento de microrganismos contaminantes como temperatura e pH do mosto (CECCATO-ANTONINI; SILVA, 1998).

2.4 Agentes indicadores de estresse em leveduras

Quando as leveduras são expostas a diversas condições de estresse, uma série de alterações metabólicas podem ser detectadas. Vias que estimulem o aumento dos teores subcelulares de glicerol, trealose e glicogênio são acionadas para garantir proteção celular e reserva de carbono e energia. A ativação desses compostos irá alterar toda a dinâmica fisiológica desses microrganismos, visto que vários precursores desses compostos são substratos associados ou intermediários da via glicolítica, uma das mais importantes na obtenção de energia química em todos os seres vivos (HOHMANN, 2002).

2.4.1 Trealose

Classificada como um dissacarídeo não redutor, a trealose é constituída por dois monômeros de glicose unidas por uma ligação α,α -1,1-glicosídeo (TAGA; SENMA; OSAKI, 1972). Apesar de vários trabalhos apontarem a função desse açúcar como sendo de reserva, atualmente a atividade como agente protetor também é amplamente aceita pela comunidade científica, principalmente em leveduras sob condições de estresse (ALCARDE; BASSO, 1997).

O aumento de trealose nas células ocorre principalmente em resposta a diversos estresses ambientais como falta de nutrientes no meio, alta pressão osmótica e variações de temperatura. No entanto, alguns trabalhos também associam o acúmulo desse metabólito em resposta ao acúmulo de etanol, visto que a trealose atua principalmente sobre a membrana plasmática das células mantendo a fluidez e evitando situações drásticas de desidratação-hidratação (THEVELYAN; HARRISON, 1956; ALCARDE; BASSO, 1997).

Crowe; Crowe e Chapeman, (1984) discutem um possível modelo para explicar a ação protetora da trealose sobre a membrana plasmática. De acordo com eles, esse metabólito minimiza os efeitos de desidratação uma vez que interage com os grupos polares dos fosfolípidios e proteínas. Essas interações impedem a ruptura lateral dos lípidios de membrana, mantém a sua fluidez e evita a desnaturação de diversas proteínas durante oscilações drásticas de temperaturas.

A trealose é mantida em concentrações basais durante a fase exponencial de crescimento das leveduras e em condições de abundância de glicose no meio. No entanto, quando os teores deste açúcar são reduzidos no sistema, observa-se um rápido aumento daquele dissacarídeo. Além da glicose, deficiências de nutrientes como nitrogênio, enxofre e fósforo associados ao aumento de temperatura também atuam estimulando a produção desse metabólito em *S. cerevisiae* (LILIE E PRINGLE, 1980; ARANDA; SALGADO; TAILLANDER, 2004).

Alguns trabalhos que estudaram o comportamento da trealose no ambiente subcelular das leveduras quando submetidas a situações de choque térmico mostraram que ambientes submetidos a altas temperaturas induziram um rápido acúmulo de trealose no meio intracelular. No entanto, a simples redução dos níveis de calor no sistema levou a uma rápida queda dos teores absolutos desse metabólito (ATTFIELD, 1987; HOTTIGER; SCHUMTZ; WIEMKEN, 1987). Juntamente a isso, a análise da variação da expressão de um dos genes que

codifica o complexo trealose-6-fosfato sintase, fundamental na biossíntese desse metabólito, apresentou um aumento médio de seis vezes durante condições de altas temperaturas em relação a temperaturas controle (AN et al., 2011).

Além disso, a trealose atua na manutenção da viabilidade celular durante o processo fermentativo. Alguns trabalhos mostraram que as células de *S. cerevisiae* presentes em ambientes com alto teor alcoólico mantiveram sua viabilidade, devido, entre outros fatores, ao acúmulo de trealose (MANSURE; SOUZA; PANEK, 1997; BENAROUDJ; LEE; GOLDBERG, 2001).

2.4.2 Glicogênio

O glicogênio é um polissacarídeo ramificado constituído unicamente por monômeros de glicose. As principais funções associadas a esse carboidrato são as de reserva de energia e carbono. Em leveduras observa-se o aumento da produção e estoque desse açúcar quando as condições ambientais de deficiências de glicose e de nitrogênio são agravadas (ROTHMAN-DENES; CABIB, 1970; LILLIE; PRINGLE, 1980; PARROU et al., 1999).

Além do glicogênio outro açúcar pode atuar como fonte de reserva: a trealose. Ao entrarem na fase estacionária, as leveduras iniciam o acúmulo desse açúcares como garantia do fornecimento de ATP em processos básicos como divisão celular (SILLJÉ et al., 1999).

Uma característica interessante das leveduras é a ordem de prioridade metabólica desses açúcares. Sob condições de estresse prolongado as células metabolizam primariamente a conversão de glicogênio em trealose, garantindo assim as funções de proteção do dissacarídeo. Contudo, ao melhorar as condições ambientais as células degradam primariamente a trealose acumulada. Somente quando esse metabólito atinge condições basais ocorre a quebra do glicogênio (SHI et al., 2010).

2.4.3 Glicerol

Ao longo do processo fermentativo a levedura utiliza principalmente açúcares para obter carbono e energia no seu desenvolvimento. Uma das consequências diretas desse metabolismo é a produção de metabólitos como etanol e glicerol, que ao se acumularem no meio provocam mudanças significativas tanto no metabolismo

da levedura como no ambiente em si (BANAT et al., 1998; BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008).

A biossíntese de glicerol é aumentada quando a levedura utiliza processos anaeróbicos para a obtenção de energia. Sob essas condições, o poder redutor presente nas moléculas de NADH é consumido, produzindo moléculas de NAD⁺ garantindo a manutenção da capacidade fermentativa (ANSELL et al., 1997; WANG et al., 2001; BASSO; ALVES; AMORIM, 1996). Quando a levedura encontra ambientes com disponibilidade de oxigênio a produção de glicerol é reduzida a níveis basais, exceto sob condições de baixo potencial osmótico, no qual o glicerol atua como osmorregulador (BLOMBERG; ADLER, 1992 apud COSTENOBLE et al., 2000). O aumento dos teores de glicerol na célula irá garantir que a pressão de turgor se mantenha estável mesmo sob condições de desidratação (ATTFIELD, 1997).

Vários fatores contribuem para o aumento dos teores de glicerol no processo de fermentação industrial. Além da linhagem de levedura utilizada, aumentos da temperatura, pH e concentrações de açúcares no meio geram o acúmulo desse metabólito (GUTIERREZ; DE MARTIN-ORELLI, 1991).

Tanto o processo de biossíntese de etanol como o de glicerol, utilizam agentes redutores na sua biossíntese. Desta maneira o acúmulo de glicerol no processo fermentativo significará uma redução da eficiência de produção de etanol (BASSO; ALVES; AMORIM, 1996). Com o intuito de diminuir a eficiência de formação de glicerol vários trabalhos tem buscado alterar os perfis de expressão de genes que codificam enzimas-chave no seu processo de biossíntese (NISSEN et al., 2000a; NISSEN et al., 2001b; PAGLIARDINI et al., 2010). Contudo, o glicerol apresenta papel essencial na manutenção da viabilidade celular, principalmente sob condições de altos teores de etanol e pressão osmótica, alterações na produção deste causaram sérios desequilíbrios nas células em decorrência da rápida perda do efeito protetor associado a esse composto (LI et al., 2009b).

2.5 Estudos de expressão gênica

Estudos que busquem obter dados quantitativos de RNA e proteínas são cada vez mais comuns nos dias atuais. Graças aos avanços em estudos genômicos, como o sequenciamento de diversos genomas de organismos, tem sido possível identificar cada vez mais a diversidade gênica e sua evolução numa determinada

espécie. Uma aplicação dessa grande quantidade de informação, que tem sido cada vez mais utilizada, é a realização de estudos que busquem analisar a atividade transcricional de uma grande quantidade de genes concomitantemente (MEYERS et al., 2004). O maior fator limitante nesse tipo de estudo foi, durante alguns anos, a deficiência tecnológica na produção e armazenamento de dados e, de maneira não menos importante, na análise desse grande volume de informações geradas. No entanto, nos últimos 20 anos o desenvolvimento de tecnologias como “Serial Analysis of Gene Expression” (SAGE), PCR em tempo Real, Microarranjos de DNA e sequenciamento de RNA (RNA-Seq) permitiram avanços significativos na produção e qualidade dessas informações (MITRA et al., 2003; WORTMAN et al., 2003; MIKKILINENI et al., 2004).

As diversas tecnologias atuais permitem a análise do perfil transcricional global através da utilização de populações de mRNA presentes em células e/ou tecidos específicos. Apesar do princípio geral, cada metodologia gera dados que devem ser analisados com critério, visto que, a alta sensibilidade das técnicas e a grande variação experimental podem gerar variações significativas nos resultados. A presença de vantagens e desvantagens associadas a cada tecnologia mostra que estas atuam de maneira complementar e que a utilização de cada uma deve ser acertada após uma avaliação precisa dos objetivos do trabalho proposto (CLOSE et al., 2004; MEYERS et al., 2004).

Quando não se conhece previamente as sequências dos transcritos, o objetivo principal é a identificação destes através da utilização de tecnologias como “*Expression Sequence Target*” (ESTs), SAGE ou “*Massively Parallel Signature Sequencing*” (MPSS) (NIELSEN; WERNERSSON; KNUDSEN, 2003; TALLA et al., 2003). Essas análises são definidas como sendo do tipo aberta da expressão gênica. De maneira contrária, análises fechadas, como a maioria dos microarranjos de DNA, são aquelas utilizadas em trabalhos em que se possui um conhecimento prévio das sequências gênicas, permitindo por exemplo, o desenho de sondas para ensaios de hibridização (KUO et al., 2002). Estudos genômicos geralmente utilizam o princípio de análises abertas, enquanto análises fechadas apresentam características mais pontuais e geralmente são mais baratas (YUEN et al., 2002).

2.5.1 Microarranjos de DNA

A técnica de microarranjos de DNA representou um grande avanço em estudos de expressão gênica devido a capacidade de mensurar os níveis de expressão de milhares de genes simultaneamente (SCHENA et al., 1995). Com essa técnica se tornou possível monitorar quantitativamente transcritos utilizando oligonucleotídeos ou moléculas de cDNA (MEYERS et al., 2004). A técnica utiliza sequências de DNA marcadas com nucleotídeos fluorescentes, principalmente “Cy3” e “Cy5” para realizar possíveis hibridizações com sequências de genes específicos, previamente conhecidos. Nesse sentido, a interação é medida pela afinidade entre bases nitrogenadas (HALL et al., 2000; SCHENA, 1996). Esse método é bem mais vantajoso do que outras técnicas de hibridização DNA como “*Southern blotting*” e “*Northern blotting*”, que utilizam membranas móveis, pois reduz a necessidade de áreas maiores para ocorrer a hibridização do material com as sequências de DNA específicas (LOKHART et al., 1996; ZHU; WANG, 2000).

As primeiras lâminas utilizadas em ensaios de microarranjos foram obtidas através da inserção de fragmentos de cDNA via tecnologias de robótica em lâminas de vidro (SCHENA et al., 1995). No entanto, esses materiais exigiam grande cuidado com a manutenção, sendo necessária a validação dos clones através de reações de PCR em larga escala (CLOSE et al., 2004). Uma alternativa viável foi a substituição desse sistema pela utilização de pequenos oligonucleotídeos que atuam como sondas (MEYERS et al., 2004). Dentre as muitas vantagens desse novo sistema está a maior facilidade de síntese desses oligos, a maior quantidade de material produzido, inclusive diretamente na superfície sólida (“*in situ*”) e o maior poder de identificação de regiões alvoespecíficas a partir de sequências de DNA únicas, como as “*Open reading frame*” (ORFs) encontradas comumente em sequências de DNA (WORTMAN et al., 2003). No entanto, seja qual for a tecnologia utilizada nas análises de microarranjos o principal é que as sequências utilizadas no ensaio estejam corretas na sua identificação e associação com o material base (MEYERS et al., 2004).

As limitações da técnica de microarranjos estão associadas ao princípio fundamental da tecnologia: o processo de hibridização. A presença de regiões duplicadas no genoma impedem a distinção de sequências altamente semelhantes por parte dos oligos ou moléculas de cDNA (ISHII et al., 2000). Dessa maneira, dados de expressão de um único gene seriam prejudicadas por hibridizações

inespecíficas. Para se ter uma ideia da magnitude desse erro, em *Arabidopsis thaliana*, cerca de 60% do genoma é duplicado e 17% dos genes estão em tandem nos arranjos (BLANC et al., 2000; GRANT; CREGAN; SHOEMAKER, 2000; VISION; BROWN; TANKSLEY, 2000; SIMILLION et al., 2002). Contudo, a utilização de oligos no lugar de arranjos de cDNA implica na possibilidade de confecção de sondas baseadas em regiões de dissimilaridade entre genes geralmente similares, aumentando a especificidade e minimizando esse erro (TALLA et al., 2003).

A principal vantagem na utilização dos microarranjos é sem dúvida a capacidade de analisar um número muito grande de genes e de amostras experimentais simultaneamente (HALL et al., 2000; BUSTIN, 2000; OONO et al., 2003). Graças a esse poder tem sido possível, por exemplo, a exploração de diferentes perfis metabólicos e controles genéticos numa escala sistêmica (DERISI; IYER; BROWN, 1997). Além disso, essa técnica permite análises de perfis de expressão de vários genes de interesse paralelamente e com resultados diretos obtidos em um único experimento. Outra vantagem que merece destaque é a capacidade de analisar a expressão de genes desconhecidos a partir de hibridizações feitas com sequências depositadas em bancos de dados (KHAN; ET, 1999 e YAMADA et al., 2003).

Um ponto importante a ser considerado nas análises de dados obtidos por microarranjos é a sua padronização. Esses cuidados irão permitir uma comparação mais facilitada por diversos laboratórios e grupos de pesquisa (KAPRANOV et al., 2002). Com o intuito de alcançar esses objetivos, foi criado o protocolo de informação mínima sobre um experimento de microarranjo (MIAME), que garante, por exemplo, um número mínimo de detalhes para que os resultados produzidos em um determinado experimento possam ser capazes de serem interpretados e reproduzidos de maneira independente (BRAZMA et al., 2001). Por fim, para que seja feita uma análise correta dos dados obtidos é necessário a realização da normalização. Erros experimentais, principalmente oriundos da marcação com agentes fluorescentes, podem causar diferenças significativas no levantamento de expressões gênicas (BASSET; EISEN; BOGUSKI, 1999). Nesse sentido, todos esses problemas potenciais devem ser condensados matematicamente numa constante multiplicativa que irá permitir que as análises de intensidade de fluorescência medidas sejam corretamente correlacionadas aos dados biológicos (RUAN; GILMORE; CONNER, 1998).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Informações gerais

Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (LBMP) da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ)/ Universidade de São Paulo (USP), sob a coordenação e orientação do Professor Márcio de Castro Silva Filho.

3.2 Material biológico, ensaio fermentativo e confecção dos microarranjos de DNA

Nesse trabalho foi utilizada a linhagem industrial PE-2 da espécie *Saccharomyces cerevisiae* adquirida junto à empresa Fermentec (www.fermentec.com.br). O ensaio fermentativo em que o material biológico foi coletado respeitou todas as condições de fermentação industrial com um tempo total de 18 horas. Nas primeiras 8 horas do processo houve a alimentação da dorna com mosto. As coletas das amostras foram realizada nos tempos 0, 6, 12 e 18 horas de fermentação. O procedimento foi realizado respeitando todas as condições industriais com batelada alimentada e reciclo de células. Finalizada essa etapa, foi extraído o RNA total das amostras que mostrou-se de alta qualidade e livre de contaminações de DNA. Estes foram encaminhados à empresa Roche (www.roche.com.br) para a confecção dos microarranjos de DNA. Essa tecnologia é baseada no conceito bioquímico de hibridização específica, ou seja, sequências nucleotídicas complementares apresentam hibridização estável, o que não acontece com as não complementares.

Uma das principais formas de analisar dados gerados por microarranjos de DNA é através da realização de comparações relativas entre os diversos tratamentos. Desta maneira, os inúmeros fatores não passíveis de controle e que afetam a razão de proporcionalidade entre as amostras estudadas são reduzidos, idealmente, a proporção entre as duas fontes originais de molécula de RNA. Nesse sentido, a razão de expressão gênica entre as duas condições biológicas distintas de interesse pode ser estimada por uma razão de hibridização entre suas respectivas moléculas de DNA com o DNA complementar presente nas lâmina de microarranjo.

3.3 Análises comparativas par a par

A análise dos padrões de expressão gênica em larga escala foi realizada através da tecnologia *NimbleGen Saccharomyces cerevisiae Gene Expression Array* (www.nimblegen.com). O chip contendo 5860 ORFs ("*Open Reading Frames*") conhecidas de levedura foi utilizado para as quatro condições de coleta descritas anteriormente. Os arquivos oriundos da plataforma *NimbleGen* foram convertidos para o formato *Affymetrix* para a realização das análises estatísticas futuras. Um *perl script* foi utilizado para gerar os arquivos de dados necessários para as comparações par a par. A normalização dos dados foi realizada através do pacote R/Biocconductor do programa R (Li; WONG, 2001; GENTLEMAN et al., 2004; SMYTH, 2004). Todos os scripts foram disponibilizados através de pedidos direto aos autores. Cinco comparações distintas foram geradas: Exp. 0.6 (experimento que compara o momento de 6 horas com 0 hora), Exp. 0.12 (12 horas *versus* 0 hora), Exp. 0.18 (18 horas *versus* 0 hora), Exp. 6.12 (12 horas *versus* 6 horas) e Exp. 12.18 (18 horas *versus* 12 horas). No final foi possível determinar genes induzidos e reprimidos com os seus respectivos valores de logFC (logaritmo de *Fold Change*, ou seja, logaritmo da razão entre o sinal do experimento/controle) significativos para cada análise.

A organização dos resultados de hibridização seguiu dois aspectos principais que refletem diretamente o interesse desse trabalho: 1) Temporal - Análise conjunta dos experimentos Exp. 0.6, Exp. 6.12 e Exp. 12.18 visando o estudo da variação da expressão gênica de leveduras industriais durante o decorrer do processo fermentativo e 2) Comparações dos diferentes tempos de coleta com 0 hora - Análise conjunta dos experimentos Exp. 0.6, Exp. 0.12 e Exp. 0.18 visando a identificação de genes diferencialmente expressos entre a condição de zero hora e as demais condições da fermentação capazes de alterar o padrão da expressão gênica da linhagem PE-2.

3.4 Análise dos genes induzidos e reprimidos

3.4.1 Análise das 5860 ORFs identificadas

A anotação funcional das 5860 ORFs identificadas no experimento de microarranjos foi realizada de acordo com o *Gene Ontology* (GO) (BLAKE; HARRIS, 2008) utilizando o algoritmo *Blast2GO* (GOTZ et al., 2008). As buscas por vias

metabólicas nas quais as ORFs estariam envolvidas, processos biológicos e topologias também foram realizadas através de *KEGG Orthology* (KO), *KEGG Pathway* (KP) e *Saccharomyces Genome Database Description* (SGD), disponíveis nos bancos de dados *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) (KANEHISA; GOTO, 2000) e *Saccharomyces Genome Database* (SGD) (CHERRY et al., 1998). Informações adicionais como domínios e famílias de proteínas também foram obtidas através do projeto InterPro (APWEILER et al., 2001; MURDER et al., 2005). Os cinquenta genes induzidos com os maiores valores de logFC para os experimentos Exp. 0.6, Exp. 0.12 e Exp. 0.18 (comparações dos diferentes tempos de coleta com 0 hora) foram destacados.

3.4.2 Identificação de vias metabólicas associadas à fermentação alcoólica

Os compostos frutose, glicose, sacarose, glicogênio, etanol, glicerol e trealose estão entre os principais associados a obtenção de energia química na forma de ATP e proteção das leveduras da espécie *S. cerevisiae* dos diversos fatores causadores de estresse no ambiente industrial (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008; BASSO et al., 2008). Utilizando esses compostos como referência foi realizada uma busca, no banco de dados KEGG, por vias metabólicas envolvidas em diferentes processos de adaptação e sobrevivência das leveduras as condições de alto etanol. Todos os genes pertencentes as vias identificadas foram levantados. Os quinze genes induzidos com as maiores variações de expressão detectadas no experimento de microarranjos (logaritmo de *Fold Change* (logFC)) para Exp. 0.6, Exp. 0.12 e Exp. 0.18 (comparações dos diferentes tempos de coleta com 0 hora) foram destacados.

Um *heatmap* foi construído para apresentar os perfis de expressão de todos os genes induzidos e reprimidos para a análise temporal (Exp. 0.6, Exp. 6.12 e Exp. 12.18) através do programa R. Foi utilizado a função *hclust* para agrupamento dos genes com perfis de expressão mais correlacionados (em termos de logaritmo de *fold change* (logFC), razão controle/tratamento) e a função *heatmap.2* (parte do pacote *gplot*) para plotagem do *heatmap*. Os genes que foram reprimidos receberam um sinal negativo para fins de distinção dos induzidos. Cada um dos perfis identificados no agrupamento tiveram seus valores percentuais e composição de genes associados as vias metabólicas identificadas.

Por fim, os arquivos de dados das vias metabólicas de *Saccharomyces cerevisiae* foram obtidos e analisados através do pacote CytoKEGG no programa Cytoscape (SHANNON et al., 2003; CLINE et al., 2007; SMOOT et al., 2011; SAITO et al., 2012). Este programa é comumente utilizado para visualizar interações entre diferentes arquivos de dados (genes, compostos e vias metabólicas, por exemplo) ao mesmo tempo que permite a visualização dos resultados obtidos em experimentos de microarranjos de DNA. Sendo assim, foi realizado o mapeamento dos perfis de expressão dos genes induzidos e reprimidos associados a cada uma das vias metabólicas identificadas para cada uma das cinco comparações par a par. Além disso, os valores percentuais de genes que foram induzidos e reprimidos nas comparações par a par foram mensurados em cada via metabólica mapeada. Um detalhe importante a ser destacado é a possível presença de um mesmo gene em diferentes pontos da via. Nestes casos, para fins dos cálculos, foram considerados a presença dos genes apenas uma única vez, eliminando erros de superestimação nos dados percentuais.

3.5 Construção de redes de correlações entre genes

Compostos subcelulares assumem variadas redes de interações que, via de regra, não podem ser compreendidas se analisadas de maneira isolada. Esse raciocínio também se aplica aos perfis de expressão gênica de um organismo, visto que, a maioria dos processos biológicos está associada ao efeito coordenado de múltiplos genes. Uma das maneiras de evidenciar essas relações é através da construção de redes de correlação entre genes, ferramenta bastante comum em análises de *Big Data*. A análise WGCNA (*Weighted Gene Co-expression Network Analysis*) disponível através do pacote R/Bioconductor (Li; WONG, 2001) é uma ferramenta que utiliza uma variação da medida de correlação de *Pearson* para construir redes de correlações entre genes identificados em experimentos de microarranjos de DNA. Esta é capaz de calcular a conectividade e sobreposições topológicas destes gerando módulos com genes altamente correlacionados (LANGFELDER; HORVATH, 2008). Devido a essas características, foi aplicada a metodologia WGCNA nos valores de expressão oriundos das cinco comparações par a par realizadas, através dos quais 72 módulos com genes altamente correlacionados foram obtidos.

3.5.1 Análise dos módulos gerados pela análise WGCNA

Com o propósito de obter informações sobre os processos biológicos que caracterizam cada um dos módulos gerados foi realizada uma busca por GOs significativos associados a cada um dos módulos através do GOrilla *webserver* ("*Gene Ontology enRichment anaLysis and visuaLizAtion tool*") (EDEN et al., 2007; EDEN et al., 2009). GOs da categoria processos biológicos foram obtidos utilizando como limite de corte (*threshold*) o p-valor de 10^{-3} .

Os GOs significativos, não redundantes, resultantes do enriquecimento realizado para cada módulo foram obtidos através do REVIGO *webserver* ("*REduce Visualize Gene Ontology*") (SUPEK et al., 2011). Como medida de referência para a eliminação dos GOs redundantes foi utilizada a medida de similaridade semântica *SimRel*, baseada nas medidas de Resnik e Lin (SCHLICKER et al., 2006). Esta calcula a similaridade funcional entre dois GOs atribuindo pontuações que podem variar de 0 (nenhuma relação) até 1 (relação máxima) (SCHLICKER et al., 2006) (Figura 2).

$$sim_{Lin}(t_1, t_2) = \frac{2 * \log p(MIA)}{\log p(t_1) + \log(t_2)}$$

Figura 2 – Equação simplificada de SimRel. Esta foi utilizada para o cálculo de conexão entre *Gene Ontology* (GO) comparados numa rede de ontologia. As variáveis t_1 e t_2 representam GOs comparados e $S(t_1, t_2)$ é o conjunto de GOs comuns a ambos na rede de ontologia
Fonte: Extraído e adaptado de Schlicker et al. (2006)

Os GOs resultantes para cada um dos módulos e suas redes de correlação foram visualizados através do programa Cytoscape (SHANNON et al., 2003; CLINE et al., 2007; SMOOT et al., 2011; SAITO et al., 2012).

3.5.2 Análises comparativas dos módulos entre os experimentos par a par

Com o propósito de comparar o grau de semelhança entre os módulos gerados nos diferentes experimentos par a par, informações sobre o número e a composição gênica de cada módulo bem como os genes comuns entre cada um destes foram obtidas. As buscas foram feitas separadamente para os módulos dos

experimentos Exp. 0.6, Exp. 0.12 e Exp. 0.18 (Comparações dos diferentes tempos de coleta com 0 hora) e Exp. 0.6, Exp. 6.12 e Exp. 12.18 (temporal). Após a conclusão dessa etapa, foi utilizado a função *hclust* (“*hierarchical cluster*”). Para agrupamento dos módulos por uma medida de distância no programa R.

Finalmente, o número de genes comuns entre os módulos foi ilustrado através de um diagrama de Venn. GOs da categoria processos biológicos foram obtidos através do GOrilla *webserver* utilizando como limite de corte (*threshold*) o p-valor de 10^{-3} (EDEN et al., 2007; EDEN et al., 2009). O REVIGO *webserver* foi utilizado para eliminação das redundâncias geradas no GOrilla *webserver* (SUPEK et al., 2011). As redes de correlação entre os GOs enriquecidos obtidos no final desse processo foram visualizadas no programa Cytoscape (SHANNON et al., 2003; CLINE et al., 2007; SMOOT et al., 2011; SAITO et al., 2012).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Análise dos 50 genes induzidos com maiores valores de logFC

Os 50 genes induzidos com maiores valores de logFC entre os 5860 genes analisados no experimento de microarranjos de DNA foram submetidos a um anotação completa: o que mostrou um grande número de genes desconhecidos. Somente os resultados observados em Exp. 0.18 mostraram mais de 60% dos genes sem função conhecida e menos de 30% com associação conhecida a vias metabólicas (Figura 3). Nesse sentido, como mostrado no presente trabalho, a identificação de um grande número de genes desconhecidos associados a vários processos de interesse para a indústria fermentativa, como tolerância a estresses durante a fermentação alcoólica, cria novos caminhos para a realização de pesquisas mais direcionadas que foquem, principalmente, no aumento da eficiência e adaptação a estresses gerados durante o processo fermentativo industrial (Anexos A a C).

Figura 3 – Valores percentuais de genes desconhecidos e associados a vias metabólicas de *S. cerevisiae* entre os 50 induzidos com maior valor de logFC para os experimentos Exp. 0.6, Exp. 0.12 e Exp. 0.18. Em azul estão destacados os valores percentuais referentes a genes com funções desconhecidas e em marrom os que puderam ser associados a alguma via metabólica no KEGG

Algumas semelhanças relevantes foram observadas entre os genes destacados nos experimentos Exp. 0.6 e Exp. 0.18. Quando analisados, esses resultados mostraram vários genes comuns relacionados a estresses oxidativo, térmico e osmótico. Destacadamente, vários genes foram induzidos em resposta a estresses no processo de replicação de DNA. Os genes GSH2 (glutathione sintase), TDHI4 (tiamina/tiazol sintase), GSP2 (proteína nuclear Ran (GTPase)), ROD1

(proteína hipotética), YNK1 (nucleosídeo difosfato quinase) e YER053C-A (proteína hipotética) são apenas alguns exemplos (Anexos A e C). Adicionalmente, os genes HMRA1 (proteína *mating type* A1), MATA1PHA2 (proteína *mating type* A2), HMLALPHA2 (proteína *mating type* A2) e CDA1 (quitina deacetilase) foram apresentaram indução de expressão exclusivamente no Exp. 0.6. A presença de vários genes associados a diferentes loci *mating type* e na biossíntese de quitosana fornece indícios da ocorrência da etapa sexuada do ciclo de vida do fungo no início da fermentação industrial (Anexo A). Como este ambiente é caracterizado por uma grande quantidade de organismos contaminantes no mosto, principalmente bactérias e outras linhagens de *S. cerevisiae*, esses resultados assumem particular importância devido a possibilidade de surgimento de novas "variantes" (híbridos entre diferentes linhagens) em decorrência da troca de material genético entre os microrganismos (BASSO et al., 2008). Por fim, corroborando com a literatura, foi observado que o gene SFC1 teve sua expressão induzida. Este codifica um carreador do soluto succinato-fumarato (chave no ciclo do ácido cítrico e presente na membrana interna de mitocôndrias) exclusivamente em Exp. 0.18 (Anexo C) (FERNÁNDEZ; FERNÁNDEZ; RODICIO, et al., 1994).

Como apresentado no Anexo B, os resultados observados no Exp. 0.12 mostraram um perfil transcricional bem diferente dos demais. Interessantemente, foram encontrados vários genes associados a via da Glicólise/Gliconeogênese: ENO2, TDH2, TDH3 e PDC6. Além disso, o gene HXT1 que codifica um transportador de baixa afinidade com glicose e que tem o seu perfil transcricional regulado pelas concentrações desse monossacarídeo no meio, também foi observado entre os genes que mais foram induzidos de Exp. 0.12. Adicionalmente, os genes AYR1 (acil glicerol fosfato redutase), NTE1 (lisofosfolípídeo hidrolase), CK11 (colina quinase) relacionados as vias do metabolismo de glicerolípídeos e do metabolismo de glicerofosfolípídeos sugerem a ocorrência de alterações significativas no perfil de expressão de genes relacionados a biossíntese de fosfolípídeos e demais componentes de membrana. Estas alterações podem ser uma resposta fisiológica ao estresse oxidativo gerado em decorrência do aumento dos teores de etanol no meio (Anexo B). Ademais, a presença destes genes entre os mais induzidos pode indicar vários problemas de fluidez e polaridade nas membranas em decorrência do aumento de etanol no meio. Estas modificações podem causar a perda de seletividade culminando na morte celular (BANAT et al.

1998). Além disso, o glicerol, metabólito secundário presente na via do metabolismo de glicerolipídeos e acumulado no ambiente subcelular de leveduras em resposta a perda da pressão de turgor, é o principal composto utilizado pelas células desses fungos para evitar a perda de água e consequente desidratação (BASSO et al., 2008).

O perfil transcricional observado em Exp. 0.12 revelou um grande número de genes ligados a importantes mecanismos de obtenção de energia em *S. cerevisiae*. A presença do gene HXT1 entre os mais induzidos sugere uma grande disponibilidade de glicose no meio, uma das principais fontes de energia redutora e carbono para os seres vivos.

4.2 Identificação e análise de vias metabólicas e genes associados ao processo de fermentação industrial

A utilização dos compostos etanol, frutose, glicerol, glicogênio, glicose, sacarose e trealose como referências, permitiram a identificação de 7 vias metabólicas e 154 genes (Tabela 1).

Tabela 1 - Compostos de referência utilizados nesse trabalhos com suas respectivas vias metabólicas

Metabólito	Vias metabólicas
Etanol	Glicólise/Gliconeogênese.
Frutose	Metabolismo de amido e sacarose. Metabolismo de frutose e manose. Metabolismo de galactose.
Glicerol	Metabolismo de galactose. Metabolismo de glicerolipídeos.
Glicose	Glicólise/Gliconeogênese. Metabolismo de amido e sacarose. Metabolismo de galactose. Pentose fosfato. Metabolismo de amino açúcares e nucleotídeo açúcares.
Trealose	Metabolismo de amido e sacarose.
Sacarose	Metabolismo de amido e sacarose. Metabolismo de galactose.

Adicionalmente ao que já tinha sido mostrado anteriormente para os 50 genes induzidos com maiores valores de logFC, os resultados dos genes mais induzidos dentre os 154 identificados pelas vias metabólicas mostraram novamente uma alta semelhança entre Exp. 0.6 e Exp. 0.18 (Tabela 2 e 4). Curiosamente foi observado no Exp. 0.6 o gene CDA2, idêntico a CDA, e que também codifica a enzima quitina deacetilase (Tabela 2). Por fim, vários dos genes induzidos identificados em Exp. 0.12 foram associados a via da Glicólise/Gliconeogênese. Entre estes, estavam os

parálogos ENO1 e ENO2 que codificam a enzima fosfopiruvato hidratase responsável pela penúltima etapa da formação de piruvato (Tabela 3).

Com o objetivo de identificar grupos de genes com perfis de expressão (logFC) semelhantes, um *Heatmap* foi construído para os experimentos Exp. 0.6, Exp. 6.12 e Exp. 12.18 (análise temporal) (Figura 4). Pelo menos três agrupamentos (*clusters*) puderam ser evidenciados. Interessantemente, um grande número de genes foram agrupados em perfis apresentando os padrões de controle da expressão contrastantes seguintes: Reprimido/Induzido/Reprimido (*down/up/down*) e Induzido/Reprimido/Induzido (*up/down/up*), mostrando novamente a alta semelhança entre os perfis transcricionais observados no início e fim do ciclo fermentativo. Os genes pertencentes a cada um desses perfis foram descritos no Anexo D.

Uma vez observado essas variações no perfil de expressão da levedura, cada um destes tiveram os seus genes distribuídos nas sete vias metabólicas. Todas as vias estudadas apresentaram genes em ambos os perfis *up/down/up* e *down/up/down* (Figura 5). Os genes pertencentes a cada uma das vias levantadas foram descritos no anexo D.

Com o propósito de ampliar a percepção das dinâmicas das relações entre os genes induzidos e reprimidos, foi realizado o mapeamento de todos os perfis de expressão gênica em cada uma das vias identificadas. Assim, uma vez presentes na via, estes foram destacados. Além disso, todos os genes associados a mesma função na via foram adicionados e posicionados de maneira a interagir com todos os genes e compostos que estivessem conectados. Uma observação relevante é que foram calculados os valores percentuais dos genes induzidos e reprimidos em cada uma das comparações par a par, evidenciando as alterações nos perfis de expressão de cada via ao longo do tempo (Figuras 6 a 12).

O mapeamento da via Glicólise/Gliconeogênese mostrou um grande número de genes associados a mesma função nas últimas etapas dos processos de biossíntese de etanol e acetil-coA. Foram identificados oito genes associados à atividade álcool desidrogenase (ADH1, ADH2, ADH3, ADH4, ADH5, ADH6, ADH7 e SFA1), cinco a fosfopiruvato hidratase (ENO1, ENO2, ERR1, ERR2 e ERR3),

Tabela 2 – Os 15 genes induzidos com maiores valores de logFC para o experimento Exp. 0.6 dentre os 154 identificados nas vias metabólicas levantadas nesse trabalho

Nome	logFC	Anotação
CDA1	4.63	KO: Quitina deacetilase. KP: Metabolismo de açúcares amino e açúcares nucleotídeo. SGD: Envolvida na biossíntese de quitosano, componente da parede de ascósporos.
SOL1	3.91	KO: 6-fosfogliconolactonase. KP: Pentose Fosfato. SGD: Teores da proteína aumentam em resposta a estresses na replicação do DNA. SOL1 possui o parálogo SOL2.
ADH1	3.85	KO: Álcool desidrogenase. KP: Glycolysis / Gluconeogenesis. SGD: Necessária para a redução de acetaldeído a etanol, última etapa da via glicolítica.
ERR1	3.79	KO: Enolase. KP: Glicólise/Gliconeogênese. SGD: Proteína de função desconhecida. Apresenta similaridade com enolases.
ACS1	3.78	KO: Acetil-CoA Sintetase. KP: Glicólise/Gliconeogênese. SGD: Juntamente com ACS2, atua fornecendo Acetil-CoA para acetilação de histonas no núcleo.
LRO1	3.39	KO: Fosfolipídeos: Diacilglicerol aciltransferase. KP: Metabolismo de Glicerolipídeos. SGD: Uma das várias aciltransferases que contribuem na biossíntese de triglicerídeos.
NQM1	3.29	KO: Transaldolase. KP: Pentose Fosfato. SGD: Transaldolase com função desconhecida. NQM1 possui um parálogo, TAL1.
ADH3	3.26	KO: Álcool desidrogenase. KP: Glicólise/Gliconeogênese. SGD: Envolvida no transporte de NADPH mitocondrial para o citosol sob condições anaeróbicas e produção de etanol.
PGM2	3.23	KO: Fosfoglicomutase. KP: Glycolysis / Gluconeogenesis. Pentose Fosfato. Metabolismo de Galactose. Metabolismo de Amido e Sacarose. Metabolismo de açúcares amino e açúcares nucleotídeo. SGD: Etapa chave no metabolismo de hexoses. PGM2 possui um parálogo, PGM1. Teores da proteína aumentam em resposta a estresses na replicação do DNA.
TKL2	2.99	KO: Transcetolase. KP: Pentose Fosfato. SGD: Importante para biossíntese de aminoácidos aromáticos. TKL2 possui um parálogo, TKL1.
CDA2	2.87	KO: Quitina deacetilase. KP: Metabolismo de açúcares amino e açúcares nucleotídeo. SGD: Envolvida na biossíntese de quitosano, componente da parede de ascósporos.

(continua)

Tabela 2 – Os 15 genes induzidos com maiores valores de logFC para o experimento Exp. 0.6 dentre os 154 identificados nas vias metabólicas levantadas nesse trabalho

Nome	logFC	Anotação
FBP26	2.81	KO : Frutose 2,6-bifosfatase. KP : Metabolismo de Frutose e Manose. SGD : Teores da proteína aumentam em resposta a estresses na replicação do DNA.
PFK26	2.81	KO : 6-fosfofruto-2-quinase. KP : Metabolismo de Frutose e Manose. SGD : Proteína inibida por fosfoenolpiruvato, sn-glicerol e 3-fosfato.
PGU1	2.78	KO : Poligacturonase. KP : Metabolismo de Amido e Sacarose. SGD : Enzima pectolítica.
YLR345W	2.77	KO : Frutose 2,6-bifosfatase. KP : Metabolismo de Frutose e Manose. SGD : similar a Frutose 2,6-bifosfatase. YLR345W não é um gene essencial.

* KO: KEGG Orthology; KP: KEGG Pathway; SGD: Saccharomyces Genome Database

Tabela 3 - Os 15 genes induzidos com maiores valores de logFC para o experimento Exp. 0.12 dentre os 154 identificados nas vias metabólicas levantadas nesse trabalho

Nome	logFC	Anotação
TDH3	4.31	KO : Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. KP : Glicólise / Gliconeogênese. SGD : TDH3 possui um parálogo, TDH2.
ENO2	3.55	KO : Enolase. KP : Glicólise / Gluconeogênese. SGD : Uma fosfopiruvato hidratase. ENO2 tem um parálogo, ENO1.
TDH2	3.54	KO : Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. KP : Glicólise / Gliconeogênese. SGD : TDH2 possui um parálogo, TDH3.
PDC6	3.18	KO : Piruvato descarboxilase. KP : Glicólise/Gluconeogênese. SGD : Descarboxilação de piruvato a acetaldeído. Envolvida no processo de catabolismo de aminoácidos.

ALD4 3.01 **KO:** Aldéido desidrogenase (NAD⁺). **KP:** Glicólise / Gliconeogênese. Metabolismo de Glicerolípídeos. **SGD:** Mitochondrial Aldéido desidrogenase (NAD⁺) necessária para crescimento na presença de etanol.

Tabela 3 – Os 15 genes induzidos com maiores valores de logFC para o experimento Exp. 0.12 dentre os 154 identificados nas vias metabólicas levantadas nesse trabalho

Nome	logFC	Anotação
TP11	2.96	KO: Trisefosfato isomerase (TIM). KP: Glicólise / Gluconeogênese. Metabolismo de Frutose e Manose. SGD: TP11 pode ser inibida por fosfoenolpiruvato, estimulando o metabolismo redox.
GPP1	2.93	KO: Glicerol 3-fosfatase 1. KP: Metabolismo de Glicerolípídeos. SGD: Proteína induzida em resposta a estresse osmótico e anaeróbico. GPP1 possui um parálogo, GPP2.
EXG1	2.87	KO: Gluca 1,3-beta glucosidase. KP: Metabolismo de Amido e Sacarose. SGD: Envolvida na montagem de beta-glucanos na parede celular. EXG1 possui um parálogo, SPR1.
GFA1	2.87	KO: Glicosamina--Frutose-6-fosfato aminotransferase. KP: Metabolismo de açúcares amino e açúcares nucleotídeo. SGD: Enzima envolvida na biossíntese de quitina. GFA possui um região de parálogos com as ORFs YMR084W-YMR085W.
SOL3	2.87	KO: 6-fosfogliconolactonase. KP: Pentose Fosfato. SGD: Cataliza a segunda etapa da via Pentose Fosfato. SOL3 é homóloga de SOL2 e SOL1 e paróloga de SOL4.
PGK1	2.85	KO: Fosfoglicerato quinase. KP: Glicólise/Gliconeogênese. SGD: Enzima chave da via Glicólise/Gliconeogênese. Fornece grupos fosfatos para ADP gerando ATP.
PGI1	2.84	KO: Glicose-6-fosfato isomerase. KP: Glicólise / Gluconeogênese. Pentose Fosfato. Metabolismo de Amido e Sacarose. Metabolismo de açúcares amino e açúcares nucleotídeo. SGD: Proteína envolvida em processos do ciclo celular e esporulação.
ENO1	2.82	KO: Enolase. KP: Glicólise / Gliconeogênese. SGD: Teores da proteína aumentam em resposta a estresses na replicação do DNA. ENO1 tem um parálogo, ENO2.
ALE1	2.77	KO: Lisofosfolípídeo aciltransferase. KP: Metabolismo de Glicerolípídeos. SGD: Enzima chave no ciclo de Land. O-Acilttransferase com sítio de ligação a membrana.

(conclusão)

GAL7 2.71 KO: UDPglicose--hexose-1-fosfato uridililtransferase. **KP:** Metabolismo de Galactose. Metabolismo de açúcares amino e açúcares nucleotídeo. **SGD:** Enzima envolvida no catabolismo de Galactose.

*KO: KEGG Orthology; KP: KEGG Pathway; SGD: Saccharomyces Genome Database

Tabela 4 – Os 15 genes induzidos com maiores valores de logFC para o experimento Exp. 0.18 dentre os 154 identificados nas vias metabólicas levantadas nesse trabalho

Nome	logFC	Anotação
ADH1	4.17	KO: Álcool desidrogenase. KP: Glicólise/Gliconeogênese. SGD: Necessária para a redução de acetaldéido a etanol, última etapa da via glicolítica.
ACS1	4	KO: Acetil-CoA Sintetase. KP: Glicólise/Gliconeogênese. SGD: Juntamente com ACS2, atua fornecendo Acetil-CoA para acetilação de histonas no núcleo.
LRO1	3.8	KO: Fosfolipídeos: Diacilglicerol aciltransferase. KP: Metabolismo de Glicerolipídeos. SGD: Uma das várias aciltransferases que contribuem na biossíntese de triglicerídeos.
ADH3	3.51	KO: Álcool desidrogenase KP: Glicólise/Gliconeogênese. SGD: Envolvida no transporte de NADPH mitocondrial para o citosol sob condições anaeróbicas e produção de etanol.
NQM1	3.41	KO: Transaldolase. KP: Pentose Fosfato. SGD: Transaldolase com função desconhecida. NQM1 possui um parâlogo, TAL1.
CDA1	3.36	KO: Quitina deacetilase. KP: Metabolismo de açúcares amino e açúcares nucleotídeo. SGD: Envolvida na biossíntese de quitosano, componente da parede de ascósporos.
SOL1	3.12	KO: 6-fosfogliconolactonase. KP: Pentose Fosfato. SGD: Teores da proteína aumentam em resposta a estresses na replicação do DNA. SOL1 possui o parâlogo SOL2.
YDR248C	3.09	KO: Gliconoquinase. KP: Pentose Fosfato. SGD: Gliconoquinase putativa. Semelhante a Gliconoquinasas de bactérias e humanos.
ERR3	3.03	KO: Enolase. KP: Glicólise/Gliconeogênese. SGD: Fosfopiruvato hidratase. Recupera o crescimento dos mutantes ENO1 e ENO2 em glicose.
TKL2	3	KO: Transcetolase. KP: Pentose Fosfato. SGD: Importante para biossíntese de aminoácidos aromáticos. TKL2 possui um parâlogo, TKL1.

(continua)

IMA4 2.99 **KO:** Alfa glicosidase. **KP:** Metabolismo de Galactose. Metabolismo de Amido e Sacarose. **SGD:** Idêntica a IMA3.

Tabela 4 – Os 15 genes induzidos com maiores valores de logFC para o experimento Exp. 0.18 dentre os 154 identificados nas vias metabólicas levantadas nesse trabalho

Nome	logFC	Anotação
IMA3	2.97	KO: Alfa glicosidase. KP: Metabolismo de Galactose. Metabolismo de Amido e Sacarose. SGD: Idêntica a IMA3.
DSF1	2.83	KO: Manitol 2-desidrogenase. KP: Metabolismo de Frutose e Manose. SGD: Putativa Manitol 2-desidrogenase. DSF1 possui um parálogo, YNR073C.
YLR345W	2.77	KO: Frutose 2,6-bifosfatase. KP: Metabolismo de Frutose e Manose. SGD: similar a Frutose 2,6-bifosfatase. YLR345W não é um gene essencial.
YNR073C	2.74	KO: Manitol 2-desidrogenase. KP: Metabolismo de Frutose e Manose. SGD: Putativa Manitol 2-desidrogenase. YNR073c possui um parálogo, DSF1.

*KO: KEGG Orthology; KP: KEGG Pathway; SGD: Saccharomyces Genome Database

Figura 4 – *Heatmap* obtido a partir da clusterização dos valores de logFC dos 154 genes identificados para os experimentos Exp. 0.6, Exp. 6.12 e Exp. 12.18 (análise temporal). A escala de cores utiliza o verde e o vermelho para genes reprimidos e induzidos, respectivamente

Figura 5 – Distribuição dos diferentes perfis de expressão obtidos no *heatmap* nas vias metabólicas levantadas nesse trabalho

três responsáveis por codificar a enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (TDH1, TDH2 e TDH3), quatro associados a atividade piruvato descarboxilase (PDC1, PDC5, PDC6 e THI3), cinco genes que codificam as aldeído desidrogenases (ALD2, ALD3, ALD4, ALD5 e ALD6) e dois associados a enzima acetil-coA sintetase (ACS1 e ACS2). Vale a pena ressaltar que a maioria desses genes apresentaram os perfis de expressão contrastantes *up/down/up* e *down/up/down* na análise temporal (Figura 6). Além disso, o Exp. 0.18 foi o que apresentou um maior número de genes induzidos, cerca de 67% (Tabela 5).

Figura 6 – Mapeamento dos genes induzidos e reprimidos na via da Glicólise/Gliconeogênese. Triângulos, círculos e losangos indicam genes, compostos e vias metabólicas associadas, respectivamente. A) Modelo da via contendo os nomes de todos os componentes e suas respectivas posições; B) Mapeamento completo dos genes para os cinco experimentos par a par. As cores verde e vermelha representam genes reprimidos e induzidos, respectivamente. O composto etanol está destacado em cinza escuro. As siglas utilizadas no modelo foram detalhadas no anexo E.

Tabela 5 – Valores percentuais de induzidos e reprimidos da via da Glicólise/Gliconeogênese presentes nos experimentos Exp. 0.6, Exp. 0.12, Exp. 0.18, Exp. 6.12 e Exp. 12.18

Experimentos	Down	Up
Exp. 0.6	54,5%	45,5%
Exp. 0.12	40,0%	60,0%
Exp. 0.18	32,7%	67,3%
Exp. 6.12	43,6%	56,4%
Exp. 12.18	52,7%	47,3%

A via do metabolismo de amido e sacarose apresentou três importantes compostos associados a produção de etanol e proteção contra estresses ambientais: glicose, sacarose e trealose. Como apresentado na Figura 7, existem três genes associados à degradação de trealose em *S. cerevisiae*: NTE1 (trealase neutra 1), NTE2 (trealase neutra 2) e ATH1 (trealase ácida). Interessantemente, estes três genes também apresentaram o perfil *up/down/up* na análise temporal. Adicionalmente, quatro genes estão associados a codificação do complexo trealose 6-fosfato sintase: TPS1 (subunidade 1), TPS2 (subunidade 2), TPS3 e TSL1 (subunidade 3). ALCARDE (1997) discute a importância da trealose sobre a membrana plasmática das células. Segundo o autor, esta apresenta papel chave na manutenção da fluidez, ao mesmo tempo que evita oscilações drásticas de desidratação-hidratação. Além disso, vários trabalhos têm mostrado que os aumentos desse dissacarídeo nas leveduras ocorre principalmente em resposta a estresses ocasionados pela alta pressão osmótica e acúmulo de etanol (TREVELIAN; HARRISON, 1956; ALCARDE; BASSO, 1997). Coerentemente, a maioria dos genes associados ao complexo trealose 6-fosfato sintase estão induzidos nos Exp. 0.18 e Exp. 12.18. No entanto, o mesmo é observado para os genes associados ao catabolismo desse dissacarídeo. Uma das possíveis explicações para esses resultados está em sua função de açúcar de reserva associada a trealose. A presença de baixas concentrações de outros açúcares no meio podem ter induzido a expressão desses genes no intuito de oxidar a trealose e gerar ATP. Por fim, também foi observado que os genes NTE1, NTE2 e ATH1 foram induzidos na comparação de 6 h. com o 0 hora. Esses resultados indicam uma degradação acentuada desse metabólito no início da fermentação. Considerando a prática de reciclo de células, as leveduras oriundas do ciclo fermentativo anterior, utilizadas como inóculo na batelada alimentada seguinte podem ainda apresentar sua fisiologia adaptada para melhor tolerar as condições de alto etanol e estresses diversos no final de ciclo. Nesse sentido, toda a trealose acumulada no final do ciclo anterior pode estar sendo degradada no início da nova etapa (Figura 7 e Tabela 6).

Notadamente, o presente trabalho tem mostrado em diversos momentos distintos que um grande número de genes estão associados aos perfis contrastantes *up/down/up* e *down/up/down*. Esses resultados, semelhantemente ao mencionado anteriormente para a trealose, podem ter uma das suas explicações associadas ao reciclo de células ao longo dos ciclos fermentativos industriais. Considerando que as

O mapeamento da via do metabolismo de galactose mostrou um grande número de genes associados à função de hidrólise de carboidratos de cadeia curta: cinco codificantes de isomaltases (IMA1, IMA2, IMA3, IMA4 e IMA5), dois de maltases (MAL12 e MAL32) e um de invertase (SUC2). Como apresentado na Figura 8, três compostos destacados estão diretamente associados a esses genes: frutose, glicose e sacarose. A comparação de 12 h. com o controle 0 hora e 18 h. com 12 horas mostrou um grande número de genes reprimidos e induzidos, respectivamente (Tabela 7).

Figura 8 – Mapeamento dos genes induzidos e reprimidos na via do metabolismo de galactose. Triângulos, círculos e losangos indicam genes, compostos e vias metabólicas associadas, respectivamente. A) Modelo da via contendo os nomes de todos os componentes e suas respectivas posições; B) Mapeamento completo dos genes para os cinco experimentos par a par. As cores verde e vermelha representam genes reprimidos e induzidos, respectivamente. Os compostos glicose, sacarose e trealose estão destacados em cinza escuro. As siglas utilizadas no modelo foram detalhadas no anexo E.

Tabela 7 – Valores percentuais de genes induzidos e reprimidos da via do metabolismo de galactose presentes nos experimentos Exp. 0.6, Exp. 0.12, Exp. 0.18, Exp. 6.12 e Exp. 12.18

Experimentos	Down	Up
Exp. 0.6	63,6%	36,4%
Exp. 0.12	72,7%	27,3%
Exp. 0.18	45,5%	54,5%
Exp. 6.12	63,6%	36,4%
Exp. 12.18	31,8%	68,2%

A via do metabolismo de glicerolípídeos se destacou como sendo a única a apresentar o glicerol entre os seus compostos mapeados. O aumento dos níveis citoplasmáticos desse metabólito sinaliza a tentativa fisiológica de atenuar os danos causados pela desidratação celular em decorrência, principalmente, do estresse osmótico (ALEXANDER et al., 2001; BELLÍ et al., 2001; MAGER; SIDERIUS, 2002). Dentre os muitos genes mapeados nessa via, destacam-se aqueles que codificam glicerol 3-fosfatase, uma enzima que catalisa a última etapa de biossíntese deste composto. Com o perfil transcricional *down/up/down* para a análise temporal, os genes GPP1 e HOR2 indicam que acúmulo desse metabólito ocorre predominantemente em um momento intermediário da fermentação (Figura 9). Coerentemente, as comparações dos momentos de 12 horas em relação ao controle 0 hora e de 12 horas com 6 horas foram as que mostraram o maior valor percentual de genes induzidos (Tabela 8).

A via das pentoses fosfato é considerada uma das principais fontes de NADPH, uma importante fonte de energia redutora necessária para a atividade de muitas enzimas envolvidas em vias biossintéticas. Nesse sentido, apesar de não ter nenhum composto de referência mapeado diretamente na sua estrutura, essa via se destaca por estar envolvida no processo de biossíntese de pentoses para formação de nucleotídeos. Adicionalmente, esta apresenta um número significativo de genes comuns à via Glicólise/Gliconeogênese. Por fim, os genes que codificam a enzima 6-fosfoglicolactona, SOL1, SOL2, SOL3 e SOL4, também estão inseridos dentro dos dois perfis de genes contrastantes *down/up/down* (SOL2 e SOL3) e *up/down/up* (SOL1 e SOL4) para a análise temporal (ver Figura 10). Os valores percentuais de genes induzidos e reprimidos nessa via podem ser observados na Tabela 9.

Além da via das pentoses fosfato, a via do metabolismo de amino açúcares e nucleotídeo açúcares foi outra das sete vias analisadas que não apresentou um dos metabólitos mapeados diretamente. No entanto, essa se destacou por apresentar vários genes comuns com outras três vias de interesse nesse trabalho: Glicólise/Gliconeogênese, metabolismo de galactose e metabolismo de frutose e manose. Essas observações indicam um papel chave da via do metabolismo de amino açúcares e nucleotídeo açúcares em processos relacionados a metabolismo de carboidratos em *S. cerevisiae* (Figura 11). Os valores percentuais de genes induzidos e reprimidos nessa via podem ser observados na Tabela 10.

Figura 9 – Mapeamento dos genes induzidos e reprimidos na via do metabolismo de glicerolípídeos. Triângulos, círculos e losangos indicam genes, compostos e vias metabólicas associadas, respectivamente. A) Modelo da via contendo os nomes de todos os componentes e suas respectivas posições; B) Mapeamento completo dos genes para os cinco experimentos par a par. As cores verde e vermelha representam genes reprimidos e induzidos, respectivamente. O composto glicerol está destacado em cinza escuro. As siglas utilizadas no modelo foram detalhadas no anexo E.

Tabela 8 – Valores percentuais de genes induzidos e reprimidos da via do metabolismo de glicerolípídeos presentes nos experimentos Exp. 0.6, Exp. 0.12, Exp. 0.18, Exp. 6.12 e Exp. 12.18

Experimentos	Down	Up
Exp. 0.6	61,9%	38,1%
Exp. 0.12	42,9%	57,1%
Exp. 0.18	42,9%	57,1%
Exp. 6.12	28,6%	71,4%
Exp. 12.18	42,9%	57,1%

Figura 10 – Mapeamento dos genes induzidos e reprimidos na via das pentoses fosfato. Triângulos, círculos e losangos indicam genes, compostos e vias metabólicas associadas, respectivamente. A) Modelo da via contendo os nomes de todos os componentes e suas respectivas posições; B) Mapeamento completo dos genes para os cinco experimentos par a par. As cores verde e vermelha representam genes reprimidos e induzidos, respectivamente. As siglas utilizadas no modelo foram detalhadas no anexo E.

Tabela 9 – Valores percentuais de genes induzidos e reprimidos da via das pentoses fosfato presentes nos experimentos Exp. 0.6, Exp. 0.12, Exp. 0.18, Exp. 6.12 e Exp. 12.18

Experimentos	Down	Up
Exp. 0.6	57,1%	42,9%
Exp. 0.12	39,3%	60,7%
Exp. 0.18	53,6%	46,4%
Exp. 6.12	42,9%	57,1%
Exp. 12.18	60,7%	39,3%

A

Figura 11 – Mapeamento dos genes induzidos e reprimidos na via do metabolismo de amino açúcares e nucleotídeo açúcares. Triângulos, círculos e losangos indicam genes, compostos e vias metabólicas associadas, respectivamente. A) Modelo da via contendo os nomes de todos os componentes e suas respectivas posições; B) Mapeamento completo dos genes para os cinco experimentos par a par. As cores verde e vermelha representam genes reprimidos e induzidos, respectivamente. As siglas utilizadas no modelo foram detalhadas no anexo E.

Figura 12 – Mapeamento dos genes induzidos e reprimidos na via do metabolismo de amino açúcares e nucleotídeo açúcares. Triângulos, círculos e losangos indicam genes, compostos e vias metabólicas associadas, respectivamente. A) Modelo da via contendo os nomes de todos os componentes e suas respectivas posições; B) Mapeamento completo dos genes para os cinco experimentos par a par. As cores verde e vermelha representam genes reprimidos e induzidos, respectivamente. As siglas utilizadas no modelo foram detalhadas no anexo E (continuação).

Tabela 10 – Valores percentuais de genes induzidos e reprimidos da via do metabolismo de amino açúcares e nucleotídeo açúcares presentes nos experimentos Exp. 0.6, Exp. 0.12, Exp. 0.18, Exp. 6.12 e Exp. 12.18

Experimentos	<i>Down</i>	<i>Up</i>
Exp. 0.6	62,1%	37,9%
Exp. 0.12	44,8%	55,2%
Exp. 0.18	55,2%	44,8%
Exp. 6.12	41,4%	58,6%
Exp. 12.18	55,2%	44,8%

Finalmente, a última via mapeada nesse trabalho foi a do metabolismo de frutose e manose. Apenas um composto de referência foi identificado diretamente nessa via: a frutose. No entanto, os quatro genes associados à biossíntese de manitol (DSF1 e YNR073C) e sorbitol (SOR1 e SOR2) puderam ser identificados. Assim como o glicerol, esses compostos apresentam um importante papel na proteção da levedura contra o estresse osmótico, garantindo sobretudo a manutenção da pressão de turgor (ALEXANDER et al., 2001; BELLÍ et al., 2001; MAGER; SIDERIUS, 2002; HOHMANN et al., 2007). Assim, foi observado um possível acúmulo desses compostos no final da fermentação. Essas possíveis constatações são baseadas na observação de que os quatro genes estavam induzidos em Exp. 0.18 e Exp. 12.18 (Figura 12). Os valores percentuais de genes induzidos e reprimidos dessa via para cada um das cinco comparações realizadas podem ser observados na Tabela 11.

4.3 Estudos de redes de correlação e módulos gerados pela análise WGCNA

Os dados das hibridizações par a par gerados no experimento de microarranjo de DNA também foram analisados através da análise (WGCNA). Foram construídas cinco redes de correlação resultando em 72 módulos com genes altamente correlacionados. As análises para Exp. 0.6 identificaram 16 módulos, enquanto 14 módulos foram gerados para cada uma das demais comparações (Exp. 0.12, Exp. 0.18, Exp. 6.12 e Exp. 12.18). Esses resultados podem ser observados nas Figuras 13 a 17.

As análises de enriquecimento realizadas através das ferramentas GOrilla e REVIGO encontraram GOs significativos da categoria processos biológicos para 11 dos 16 módulos presentes no Exp. 0.6. Os resultados para os módulos magenta escuro, tan, roxo e azul royal foram apresentados na Figura 20. Interessantemente, o módulo azul royal (189 genes) apresentou 3 GOs não identificados nos demais grupos: "*ion transport*", "*regulation of ion transport*" e "*iron ion transport*". Além de indicar a ocorrência desses processos no início do ciclo fermentativo, esses resultados indicam que esse módulo pode conter diversos genes relacionados ao equilíbrio e transporte de íons em *S. cerevisiae* (Figura 18).

Figura 13 – Mapeamento dos genes induzidos e reprimidos na via do metabolismo de frutose e manose. Triângulos, círculos e losangos indicam genes, compostos e vias metabólicas associadas, respectivamente. A) Modelo da via contendo os nomes de todos os componentes e suas respectivas posições; B) Mapeamento completo dos genes para os cinco experimentos par a par. As cores verde e vermelha representam genes reprimidos e induzidos, respectivamente. O composto frutose está destacado em cinza escuro. As siglas utilizadas no modelo foram detalhadas no anexo E.

Tabela 11 – Valores percentuais de genes reprimidos e induzidos da via do metabolismo de frutose e manose presentes nos experimentos Exp. 0.6, Exp. 0.12, Exp. 0.18, Exp. 6.12 e Exp. 12.18

Experimentos	Down	Up
Exp. 0.6	62,5%	37,5%
Exp. 0.12	58,3%	41,7%
Exp. 0.18	33,3%	66,7%
Exp. 6.12	45,8%	54,2%
Exp. 12.18	33,3%	66,7%

Quando analisada, a comparação de 12 horas com o controle 0 hora, 12 módulos apresentaram no mínimo, um GO significativo. Os módulos siena (243 genes), verde oliva escuro (2010 genes), turquesa escuro (550 genes) e azul aço

claro (72 genes) foram destacados pelos diferentes processos biológicos identificados. A presença de uma nomenclatura similar entre os módulos não indica correlação dentro e entre comparações par a par. Curiosamente, foram encontrados vários GOs comuns associados aos módulos magenta escuro (Exp. 0.6) e siena (Exp. 0.12), indicando a presença de módulos conservados (processos biológicos) entre essas duas comparações (Figura 19).

Figura 14 – Dendrograma obtido a partir da "*Weighted Gene Co-expression Network Analysis*" (WGCNA) com os respectivos módulos identificados para o experimento Exp. 0.6

Figura 15 – Dendrograma obtido a partir da "*Weighted Gene Co-expression Network Analysis*" (WGCNA) com os respectivos módulos identificados para o experimento Exp. 0.12

Figura 16 – Dendrograma obtido a partir da "*Weighted Gene Co-expression Network Analysis*" (WGCNA) com os respectivos módulos identificados para o experimento Exp. 0.18

Figura 17 – Dendrograma obtido a partir da "Weighted Gene Co-expression Network Analysis" (WGCNA) com os respectivos módulos identificados para o experimento Exp. 6.12

Alguns resultados relevantes em processos de oxidação de compostos carbonados e produção de ATP foram observados nas análises dos módulos oriundos de Exp. 0.18, um experimento que compara o tempo de 18 h. (final da fermentação) em relação a 0 hora (início da fermentação). O módulo laranja (380 genes) apresentou vários GOs associados à respiração aeróbia ("*aerobic respiration*", "*mitochondrial electron transport, ubiquinol to cythochrome c*", "*respiratory electron transport chain*", "*electron transport chain*" e "*oxidation-reduction process*") além do "*Alcohol metabolism*". Esses resultados evidenciam a possibilidade de presença simultânea dos dois processos biológicos de obtenção de energia (aeróbio e anaeróbio) no microrganismo em condições de alto etanol em fermentadores industriais. Por fim, o módulo marrom sela (169 genes) se destacou por apresentar GOs associados ao processo de floculação, um dos grandes problemas atribuídos a perde de eficiência fermentativa e produção de etanol nas usinas (Figura 20).

Figura 18 – Dendrograma obtido a partir da "Weighted Gene Co-expression Network Analysis" (WGCNA) com os respectivos módulos identificados para o experimento Exp. 6.12

Figura 19 – Análise de enriquecimento de *Gene Ontology* (GO) para os diferentes módulos obtidos no experimento Exp. 0. 6

Figura 20 – Análise de enriquecimento de *Gene Ontology* (GO) para os diferentes módulos obtidos no experimento Exp. 0.12

Figura 21 – Análise de enriquecimento de *Gene Ontology* (GO) para os diferentes módulos obtidos no experimento Exp. 0.18

A comparação realizada no Exp. 6.12 é uma das que mais retrata o momento de alta produção de etanol no ciclo fermentativo. Nesse momento a levedura já se apresenta recuperada dos estresses oriundos da prática de reciclo de células e ainda não sofre danos oxidativos severos em decorrência do alto teor de etanol acumulado no meio. Nesse sentido, seria esperado a presença de GOs associados às atividades que envolvam o metabolismo de proteínas (atividade de biogênese subcelular) e de compostos geradores de energia. Como mostrado na Figura 21, o módulo amarelo apresentou vários GOs associados aos processos de tradução, síntese de aminoácidos e catabolismo de proteínas. Além disso, o módulo magenta escuro (332 genes) apresentou a grande maioria dos seus GOs associados ao metabolismo e transporte de carboidratos e ácidos graxos. O GO "*oxidation-reduction process*" foi um dos mais significativos nesse módulo.

Figura 22 – Análise de enriquecimento de *Gene Ontology* (GO) para os diferentes módulos obtidos no experimento Exp. 6.12

Finalmente, a comparação entre 12 e 18 horas retrata as variações observadas nas últimas seis horas do ciclo fermentativo. Vários trabalhos apontam a ocorrência de estresse oxidativo em decorrência do acúmulo de altos teores de etanol no meio (INGRAM; BUTTKE, 1984; SALGUEIRO; SÁ-CORREA; NOVAIS, 1988; BANAT et al., 1998). Os módulos gerados para essa comparação também retrataram essas condições, sendo que, foi observado no módulo Violeta (222 genes) vários GOs relacionados a eventos de transposição. Interessantemente, o

módulo Laranja Escuro (50 genes) apresentou três GOs altamente correlacionados entre si e associados ao metabolismo de ATP (Figura 22).

4.4 Análises comparativas dos módulos entre os experimentos par a par

Com o propósito de comparar os módulos gerados entre as cinco comparações par a par, foram obtidos agrupamentos (*clusters*) para as todas as comparações par a par propostas nesse trabalho. Ambos os dendogramas puderam ser divididos, no mínimo, em três grupos distintos: *cluster A*, *cluster B* e *cluster C* (Figuras 23 e 24). Os clusters A e B de cada uma das análises realizadas foram detalhados (Figura 25 a 32).

Figura 23 – Análise de enriquecimento de *Gene Ontology* (GO) para os diferentes módulos obtidos no experimento Exp. 12.18

Como apresentado na Figura 25, os módulos verde oliva escuro (1656 genes; Exp 0.6), amarelo (2004 genes; Exp. 6.12) e azul royal (1469 genes; Exp. 12.18) foram agrupados no *cluster A* da análise temporal. Os 627 genes identificados como comuns aos três módulos tiveram os seus GOs significativos da categoria processos biológicos analisados. Estes foram associados aos processos de organização e catabolismo de proteínas no ambiente subcelular (Figura 26). Adicionalmente, as análises do *cluster B*, constituído pelos módulos magenta escuro (Exp. 0.6), marrom (Exp. 6.12) e rosa (Exp. 12.18) revelaram 428 genes comuns aos três módulos (Figura 27). As análises das metodologias GOrilla e REVIGO mostraram um grande

número de GOs associados a diversos processos metabólicos de *S. cerevisiae* (Figura 28).

Adicionalmente, os dendogramas A e B das análises comparativas dos diversos tempos de coleta em relação ao tempo 0 hora foram analisados. Nesse sentido, os módulos Magenta Escuro (Exp. 0.6), Marrom (Exp. 0.12) e Marrom (Exp. 0.18) foram isolados no *cluster* A, totalizando 485 genes (Figura 29). O GO "*ergosterol metabolism*" foi um dos destacados nas análises de enriquecimento (Figura 30). Quando adicionado no meio, esse esteroide provoca o aumento da eficiência fermentativa através de uma maior produção de etanol (WALKER-CAPRIOGLIO; CASEY; PARKS, 1990; YOU; ROSENFELD; KNIPPLE, 2003; VANEGAS et al., 2012). Por fim, os módulos verde oliva escuro (1657 genes: Exp. 0.6), verde oliva escuro (2010 genes: Exp. 0.12) e vermelho (1457 genes: Exp. 0.18) foram encontrados no *cluster* B. Os 551 genes mapeados na intersecção comum aos três módulos mostraram GOs da categoria processos biológicos relacionados, entre outros, ao catabolismo de proteínas e importação de substratos para o núcleo (Figuras 31 e 32).

Figura 24 – Dendrograma obtido a partir da comparações dos diferentes módulos presentes nos experimentos Exp. 0.6, Exp. 6.12 e Exp. 12.18 (análise temporal)

Figura 25 – Dendrograma obtido a partir da comparações dos diferentes módulos presentes nos experimentos Exp. 0.6, Exp. 6.12 e Exp. 12.18 análise que compara os diferentes tempos de coleta com 0 hora)

Figura 26 – Diagrama de Venn mostrando o número de genes comuns aos diferentes módulos presentes no *cluster* A (análise temporal)

Figura 27 – Análise de enriquecimento de *Gene Ontology* (GO) para os diferentes módulos presentes no *cluster A* (análise temporal)

Figura 28 – Diagrama de Venn mostrando o número de genes comuns aos diferentes módulos presentes no *cluster B* (análise temporal)

Figura 29 – Análise de enriquecimento de *Gene Ontology* (GO) para os diferentes módulos presentes no *cluster B* (análise temporal)

Figura 30 – Diagrama de Venn mostrando o número de genes comuns aos diferentes módulos presentes no *cluster* A (análise que compara os diferentes tempos de coleta com 0 hora)

Figura 31 – Análise de enriquecimento de *Gene Ontology* (GO) para os diferentes módulos presentes no *cluster* A (análise que compara os diferentes tempos de coleta com 0 hora)

Figura 32 – Diagrama de Venn mostrando o número de genes comuns aos diferentes módulos presentes no *cluster* B (análise que compara os diferentes tempos de coleta com 0 hora)

Figura 33 – Análise de enriquecimento de *Gene Ontology* (GO) para os diferentes módulos presentes no *cluster* B (análise que compara os diferentes tempos de coleta com 0 hora)

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As leveduras possivelmente apresentam perfis transcricionais semelhantes nos momentos inicial e final da fermentação se comparadas com a fase intermediária, que se caracteriza por apresentar um maior número de genes induzidos associados a processos de obtenção de energia;
- Sete vias metabólicas foram identificadas diretamente por estarem associadas a vários compostos-chave nos processos de obtenção de energia e proteção contra estresses fisiológicos e ambientais;
- Um grande número de genes foi identificado nos perfis contrastantes *down/up/down* e *up/down/up* para as comparações Exp. 0.6, Exp. 6.12 e Exp. 12.18, relacionadas a início, meio e fim do ciclo fermentativo, respectivamente. Esses resultados destacaram, novamente, a grande semelhança entre o início e fim da fermentação alcoólica;
- Muitos dos genes identificados estavam associados à mesma função biológica. Um exemplo claro disso foi observado para a atividade da álcool desidrogenase na via Glicólise/Gliconeogênese que apresentou oito genes mapeados;
- Vários processos biológicos foram identificados e correlacionados aos diferentes momentos do ciclo fermentativo para a espécie *S. cerevisiae*.
- Em geral, os resultados conseguiram caracterizar o perfil transcricional das leveduras da linhagem PE-2 mostrando vias metabólicas e grupos de genes correlacionados aos diferentes momentos da fermentação com alto teor alcoólico em fermentadores industriais.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-BANAT, B.M.A; HOSHIDA, H.; ANO, A.; NONKLANG, S.; AKADA, R. High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 85, n. 4, p. 861-867, Jan. 2010.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1268 p.
- ALCARDE, A.R.; BASSO, L.C. Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas por liofilização. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 54, n. 3, p. 189-194, Dec.1997.
- ALDIGUIER, A.S; ALFENORE, S.; CAMELEYRE, X.; GOMA, G.; URIBELARREA, J.L.; GUILLOUET, S.E.; MOLINA-JOUE, C. Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, New York, v. 26, n. 4, p. 217-222, Apr. 2004.
- ALEXANDER, M.R.; TYERS, M.; PERRET, M.; CRAIG, B.M.; FANG, K.S.; GUSTIN, M.C. Regulation of cell cycle progression by Swe1p and Hog1p following hypertonic stress. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 12, n. 1, p. 53-62, Jan. 2001.
- ALQUATI, P.H. **Caracterização e controle de microrganismos contaminantes em microdestilaria de álcool**. 1990. 75p. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Agronomia) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 1990.
- ALTHERTUM, F.; CRUZ, M.R.M; VAIRO, M.L.R.; GAMBASSI, P.M. Efeito dos microrganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias. **STAB – Açúcar Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v.3, n.1, p. 42-49, Mar. 1984.
- AMORIM, H.V.; GRYSCHKE, M.; LOPES, M.L. The success and sustainability of the Brazilian sugarcane: Fuel Ethanol industry. **ACS Symposium Series**, Piracicaba, v. 1058, n. 1, p. 73-82, Jan. 2010.
- _____; LOPES, M.L.; OLIVEIRA, J.V.C.; BUCKERIDGE, M.S.; GOLDMAN, G.H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 91, n. 5, p. 1267-1275, Jun. 2011.
- AN, M.Z.; TANG, Y.Q.; MITSUMASU, K.; LIU, Z.S.; SHIGERU, M.; KENJI, K. Enhanced thermotolerance for ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* strain by overexpression of the gene coding for trehalose-6-phosphate synthase. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 33, n. 7, p. 1367-1374, July 2011.
- ANDRIETTA, M.G.S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S.R. Bioetanol – Brasil, 30 anos na vanguarda. **MultiCiência: Construindo a história dos produtos naturais**, São Carlos, v. 7, n. 11, p. 1-16, Nov. 2006.

_____; ANDRIETTA, S.R.; STECKELBERG, C.; STUPIELLO, E.N.A. Bioethanol – 30 years of Proálcool. **International Sugar Journal**, Campinas, v.109, n.1299, p.195-200, Aug. 2007.

ANDRIETTA, S.R.; STUPIELLO, J.P. Simulação e modelagem para processos de fermentação alcoólica contínua. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 9, n. 2, p. 45-51, Jun. 1990.

ANSELL, R.; GRANATH, K.; HOHMANN, S.; THEVELEIN, J.M.; ADLER, L. The two isoenzymes for yeast NAD⁺ dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 16, n. 9, p. 2179-2187, May 1997.

APWEILER, R.; ATTWOOD, T.K.; BAIROCH, A.; BATEMAN, A.; BIRNEY, E.; BISWAS, M.; BUCHER, P.; CERUTTI, L.; CORPET, F.; CRONING, M.D.R.; DURBIN, R.; FALQUET, L.; FLEISCHMANN, W.; GOUZY, J.; HERMJAKOB, H.; HULO, N.; JONASSEN, I.; KAHN, D.; KANAPIN, A.; KARAVIDOPOULOU, Y.; LOPEZ, R.; MARX, B.; MULDER, N.J.; OINN, T.M.; PAGNI, M.; SERVANT, F.; SIGRIST, F.; ZDOBNOV, E.M. The InterPro database, an integrated documentation resource for protein families, domains and functional sites. **Nucleic Acid Research**, v. 29, n. 1, p.37-40, Jan. 2001.

ARANDA, J.S.; SALGADO, E.; TAILLANDIER, P. Trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* cells: experimental data and structured modeling. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 17, n. 2, p. 129-140, Feb. 2004.

ARGUESO, J. L.; CARAZZOLLE, M. F.; MIECZKOWSKI, P. A.; DUARTE, F. M.; NETTO, O. V.; MISSAWA, S. K.; GALZERANI, F.; COSTA, G. G.; VIDAL, R. O.; NORONHA, M. F.; DOMINSKA, M.; ANDRIETTA, M. G.; ANDRIETTA, S. R.; CUNHA, A. F.; GOMES, L. H.; TAVARES, F. C.; ALCARDE, A. R.; DIETRICH, F. S.; MCCUSKER, J. H.; PETES, T. D.; PEREIRA, G. A. Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 19, n. 12, p. 2258-2270, Dec. 2009.

ATTFIELD, P.V. Trehalose accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* during exposure to agents that induce heat shock response. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 225, n. 1-2, p. 259- 263, Dec.1987.

_____. **Nature Biotechnology**, New York, v. 15, n. 5, p. 1351-1357, Nov. 1997.

BAI, F.W.; ANDERSON, W.A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, New York, v. 26, n. 1, p. 89-105, Sept. 2008.

BANAT, I.M.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R.; MCHALE, A.P. Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I – Yeasts in general. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 14, n. 6, p. 809-821, Nov. 1998.

your mine. **Nature Genetics Supplement**, Oslo, v. 21, n. 8, p. 51-55, Aug. 1999.

BASSO, L.C.; OLIVEIRA, A.J.; ORELLI, A.A.; CAMPOS, C.R.; GALLO, C.R.; AMORIM, H.V. **Dominância das leveduras contaminantes sobre as linhagens industriais avaliada pela técnica de cariotipagem**. Anais Congresso Nacional da STAB, Piracicaba, v. 5, n. 1, p. 246-250, Aug. 1993.

_____; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H.V. **Fermentação alcoólica e alguns fatores que afetam o desempenho fermentativo. Processo de produção de álcool: controle e monitoramento**. 2.ed. Piracicaba: FERMENTEC-FEALQ-ESALQ, 1996. 84p.

_____; CARTE, C.L.; SILVESTRINI, C.; PAULILLO, S.C.L.; LUCATTI, L.; COSTA, V.M. Estudo comparativo entre a levedura “turbo” e a PE-2 para fermentações com elevados teores alcoólicos. **Relatório Anual de Pesquisas em Fermentação Alcoólica**, Piracicaba: ESALQ/USP, v. 23, n. 1, p. 12-25, Jan. 2003.

_____; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M.L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v.8, n. 7, p. 1155-1163, Aug. 2008.

BAYROCK, D.P.; INGLEDEW, W.M. Application of multistage continuous fermentation for production of fuel alcohol by very-high-gravity fermentation technology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 27, n. 2, p. 87-93, Aug. 2001.

BELLÍ, G.; GARÍ, E.; ALDEA, M.; HERRERO, E. Osmotic stress causes a G1 cell cycle delay and downregulation of Cln3/Cdc28 activity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 39, n. 4, p. 1022-1035, Dec. 2001.

BENAROUDJ, N.; LEE, D.H.; GOLDBERG, A.L. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 276, n. 26, p. 24261-24267, June 2001.

BLAKE, J.A.; HARRIS M.A. The Gene Ontology (GO) project: structured vocabularies for molecular biology and their application to genome and expression analysis. **Current Protocols in Bioinformatics**, New York, v. 7, n. 9, p. 1-7, Sep. 2008.

BLANC, G.; BARAKAT, A.; GUYOT, R.; COOKE, R.; DELSENY, M. Extensive duplication and reshuffling in the Arabidopsis genome. **Plant Cell**, Amsterdam, v. 12, n. 7, p. 1093–1101, July 2000.

BLOMBERG, A.; ADLER, L. Physiology of osmotolerance in fungi. **Advances in Microbial Physiology**, London, v. 33, n. 8, p. 145-212, May 1992.

BOVI, R.; MARQUES, M.O. O tratamento ácido na fermentação alcoólica. **STAB Álcool e Açúcar**, Piracicaba, v. 3, n. 9, p. 10-13, Sept. 1983.

BRAZMA, A.; HINGAMP, P.; QUACKENBUSH, J.; SHERLOCK, G.; SPELLMAN, P.; STOECKERT, C.; AACH, J.; ANSORGE, W.; BALL, C. A.; CAUSTON, H. C. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. **Nature Genetic**, London, v. 29, n. 5, p. 365–371, Nov. 2001.

BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, n. 1, p. 169-193, Oct. 2000.

CARDONA, C.A.; SANCHEZ, O.J. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**, New York, v. 98, n. 12, p. 2415-57, Sep. 2007.

CASEY, G.P.; MAGNUS, C.A.; INGLEDEW, W.M. High-gravity brewing: effects of nutrition on yeast composition, fermentative ability, and alcohol production. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 48, n. 3, p. 639-646, Sept. 1984.

CASTRO, M.M.S. **Leveduras contaminantes do processo de fermentação alcoólica: diversidade taxonômica e metabólica**. 1995. 124p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimento) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

CECCATO-ANTONINI, S.R.; SILVA, D.F. Eficiência de meios diferenciais no isolamento de cepas de leveduras de processos industriais de fermentação alcoólica. **STAB Açúcar Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v.18, n. 2, p. 40-46, Dec. 1998.

CHERRY, J.M.; ADLER, C.; BALL, C.; CHERVITZ, S.A.; DWIGHT, S.S.; HESTER, E.T.; JIA, Y.; JUVIK, G.; ROE, T.; SCHROEDER, M.; WENG, S.; BOTSTEIN, D. SGD: *Saccharomyces* Genome Database. **Nucleic Acid Research**, London, v. 26, n. 4, p. 73-79, Jan. 1998.

CHUM, H.L.; WARNER, E.; SEABRA, J.E.A.; MACEDO, I.C. A comparison of commercial ethanol production systems from Brazilian sugarcane and US corn. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, Miami, V. 8, n. 15, p.205–223, May 2014.

CLINE, M.S.; SMOOT, M.; CERAMI, E.; KUCHINSKY, A.; LANDYS, N.; WORKMAN, C.; CHRISTMAS, R.; AVILA-CAMPILO, I.; CREECH, M.; GROSS, B.; HANSPERS, K.; ISSERLIN, R.; KELLEY, R.; KILLCOYNE, S.; LOTIA, S.; MAERE, S.; MORRIS, J.; ONO, K.; PAVLOVIC, V.; PICO, A.R.; VAILAYA, A.; WANG, P.L.; ADLER, A.; CONKLIN, B.R.; HOOD, L.; KUIPER, M.; SANDER, C.; SCHMULEVICH, I.; SCHWIKOWSKI, B.; WARNER, G.J.; IDEKER, T.; BADER, G.D. Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. **Nature Protocols**, London, v. 2, n. 5, p. 2366-2382, Sept. 2007.

CLOSE, T.J.; WANAMAKER, S.; CALDO, R.A.; TURNER, S.M.; ASHLOCK, D.A.; DICKERSON, J.A.; WING, R.A.; MUEHLBAUER, G.J.; KLEINHOF, A.; WISE, R.P. A new resource for cereal genomics: 22K barley GeneChip comes of age. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 134, n. 3, p. 960–968, Mar. 2004.

COSTENOBLE, R.; VALADI, H.; GUSTAFSSON, L.; NIKLASSON, C.; FRANZÉN, C.J. Microaerobic glycerol formation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, Davis, v. 16, n. 16, p. 1483-1495, Dec. 2000.

CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CHAPMAN, D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. **Science**, Washington, v. 223, n. 4637, p. 701-703, Feb.1984.

DERISI, J.L.; IYER, V.R.; BROWN, P.O. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. **Science**, Washington, v. 278, n. 5338, p. 680-686, Oct. 1997.

EDEN, E.; LIPSON, D.; YOGEV, S.; YAKHINI, Z. Discovering Motifs in Ranked Lists of DNA sequences. **PLoS Computational Biology**, New York, v. 3, n. 3, p. 25-39, Mar. 2007.

_____; NAVON, R.; STEINFELD, I.; LIPSON, D.; YAKHINI, Z. GOrilla: A Tool For Discovery And Visualization of Enriched GO Terms in Ranked Gene Lists. **BMC Bioinformatics**, London, v. 10, n. 48, p. 38-48, Feb. 2009.

ERASO, P.; GANCEDO, C. Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 224, n. 1, p. 187-192, Nov. 1987.

ESPÓSITO, R.E.; KLAPHOLZ, S.; STRATHERN, J.N.; JONES, E.W.; BROACH, J.R. Meioses and ascospore development. **The molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae***, New York, v. 69, n. 13, p. 211-287, Feb. 1981.

ESTRUCH, F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 24, n. 4, p. 469- 486, Oct. 2000.

FERNÁNDEZ, M.; FERNÁNDEZ, E.; RODICIO, R. ACR1, a gene encoding a protein related to mitochondrial carriers, is essential for acetyl-CoA synthetase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 242, n. 6, p. 727-735, Mar. 1994.

FERREIRA, R.J.A. **Tecnologia de produção de álcool: fermentação alcoólica**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008. 73 p. Apostila.

FURLAN, R.M.C. **Seleção de leveduras para a fermentação com alto teor alcoólico a partir da biodiversidade encontrada em destilarias brasileiras**. 2012. 126 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2012.

GALLO, C.R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica**. Campinas. 1989. 388 p. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 1989.

GENTLEMAN, R.C.; CAREY, V.J.; BATES, D.M.; BOLSTAD, B.; DETTLING, M.; DUDOIT, S.; ELLIS, B.; GAUTIER, L.; GE, Y.; GENTRY, J.; HORNIK, K.; HOTHORN, T.; HUBER, W.; IACUS, S.; IRIZARRY, R.; LEISCH, F.; LI, C.; MAECHLER, M.; ROSSINI, A.J.; SAWITZKI, G.; SMITH, C.; SMYTH, G.; TIERNEY, L.; YANG, J.Y.H.; ZHANG, J. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. **Genome Biology**, London, v. 5, n. 10, p. 1175-1186, Sept. 2004.

GOFFEAU, A.; BARRELL, B.G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R.W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOSEISEL, J.D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LOUIS, E.J.; MEWES, H.W.; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSEN, P.; TETTELIN, H.;

OLIVER, S.G. Life with 6000 genes. **Science**, Washington, v. 274, n. 5287 p. 563-567, Oct. 1996.

GOTZ, S.; GARCIA-GOMEZ, J.M.; TOREL, J.; WILLIAMS, T.D.; NAGARAJ S.H.; NUEDA, M.J.; ROBLES, M.; TALON, M.; DOPAZO J.; CONESA, A. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. **Nucleic Acids Research**, London, v. 36, n. 10, p. 3420-3435, Jun. 2008.

GRANT, D.; CREGAN, P.; SHOEMAKER, R.C. Genome organization in dicots: genome duplication in Arabidopsis and synteny between soybean and Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 97, n. 8, p. 4168-4173, Apr. 2000.

GUERREIRO, M.A. **Desenvolvimento de um sistema especialista para o projeto de unidades industriais de produção de álcool**. 1995. 221p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

GUIMARÃES, T.M. **Identificação e seleção de cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para elaboração de vinho**. 2005. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

GUTIERREZ, L.E.; DE MARTIN ORELLI, V.F. Efeito do nitrito sobre a fermentação alcoólica realizada por *Saccharomyces cerevisiae*. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, Piracicaba, v. 48, n. 109, p. 41-54, Nov. 1991.

HAHN-HAGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M.F.; LIDEN, G.; ZACCHI, G. Bioethanol: the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends Biotechnology**, New York, v. 24, n. 12, p. 549-556, Dec. 2006.

HALL, C.W. Energy sources and conversions relating foods: *food and energy resources*. **The Nacional Academy press**, San Francisco, v. 3, n. 4, p. 25-42, Aug. 1984.

HALL, N.L. W.; VORST, O.; VAN-HOUWELINGEN, A.M.M.L.; KOK, E.J.; PEIJNENBURG, A.; AHARONI, A.; VAN-TUNEN, A.J.; KEIJER, J. The application of DNA microarray in gene expression analysis. **Journal of Biotechnology**, London, v. 78, n. 3, p. 271-280, Mar. 2000.

HOHMANN, S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 66, n. 2, p. 300-372, Jun. 2002.

_____; KRANTZ, M.; NORDLANDER, B. Yeast osmoregulation. **Methods in Enzymology**, New York, v. 428, n. 4, p. 29-45, Jan. 2007.

HOTTIGER, T.; SCHMUTZ, P.; WIEMKEN, A. Heat-induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 169, n. 12, p. 5518-5522, Dec. 1987.

HUANG, H.; GUO, X.; LI, D.; LIU, M.; WU, J.; REN, H. Identification of crucial yeast inhibitors in bio-ethanol and improvement of fermentation at high pH and high total solids. **Bioresource Technology**, New York, v. 102, n. 16, p. 7486-7493, Aug. 2011.

HUUSKONEN, A.; MARKKULA, T.; VIDGREN, V.; LIMA, L.; MULDER, L.; GEURTS, W.; WALSH, M.; LONDESBOROUGH, J. Selection from industrial lager yeast strains of variants with improved fermentation performance in very-high-gravity worts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 5, p. 1563-1573, Jan. 2010.

INGLEDEW, W.M. **Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast primer, in the alcohol textbook**. 3.ed. London: Nottingham University Press, 1999. 87p.

INGRAM, L.O. Adaptation of membrane lipids to alcohols. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 125, n. 2, p. 670-678, Feb. 1976.

_____; BUTTKE, T.M. Effects of alcohols on microorganisms. **Advances in Microbial Physiology**, London, v. 25, p. 253-300, Apr. 1984.

ISHII, M.; HASHIMOTO, S.; TSUTSUMI, S.; WADA, Y.; MATSUSHIMA, K.; KODAMA, T.; ABURATANI, H. Direct comparison of GeneChip and SAGE on the quantitative accuracy in transcript profiling analysis. **Genomics**, London, v. 68, n. 2, p. 136-143, Sept. 2000.

JIMÉNEZ, J.; BENÍTEZ, T. Adaptation of yeast cell membranes to ethanol. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n. 5, p. 1196-1198, May 1987.

JOHN, G.S.M.; GAYATHIRI, M.; ROSE, C.; MANDAL, A.B. Osmotic shock augments ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 2918. **Current Microbiology**, New York, v. 64, n. 2, p. 100-105, Oct. 2012.

JONES, R.C.; HOUGH, J.S. The effect of temperature on the metabolism of baker's yeast growing on continuous culture. **Journal of General Microbiology**, London, v. 60, n. 1, p. 107-116, Jan. 1970.

JONES, R.P. Biological principles for the effects of ethanol. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 11, p. 130-153, Mar. 1989.

KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic Acid Research**, London, v. 28, n. 1, p. 27-30, Jan. 2000.

KAPRANOV, P.; CAWLEY, S.E.; DRENKOW, J.; BEKIRANOV, S.; STRAUSBERG, R.L.; FODOR, S.P.; GINGERAS, T.R. Large-scale transcriptional activity in chromosomes 21 and 22. **Science**, Washington, v. 296, n. 5569, p. 916-919, May 2002.

KHAN, J.; ET, A.L. DNA microarray technology: the anticipated impact on the study of human disease. **Biochemistry, Biophysic Acta**, v. 1423, n. 4442, p. 17-28, Aug. 1999.

KUO, W.P.; JENSSEN, T.K.; BUTTE, A.J.; OHNO-MACHADO, L.; KOHANE, I.S. Analysis of matched mRNA measurements from two different microarray technologies. **Bioinformatics**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 405–412, Mar. 2002.

LANGFELDER, P.; HORVATH, S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. **BMC Bioinformatics**, London, v. 9, n. 12, p. 551-559, Dec. 2008.

LEÃO, C.; van UDEN, N. Effects of ethanol and other alkanols on passive proton influx in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 774, n. 1, p. 43-48, Jul. 1984.

LILLIE, S.H.; PRINGLE, J.R. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 143, n. 3, p. 1384-1394, Sept. 1980.

LIMA, U.A.; GOLDONI, J.S.; CEREDA, M.P.; SOUZA, L.G. de. Ocorrência de microrganismos em caldo bruto, caldo misto e água de embebição em uma usina de açúcar de cana. **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 4, p. 21-27, Jun. 1974.

LI, F.; ZHAO, X.Q.; GE, X.M.; BAI, F.W. An innovative consecutive batch fermentation process for very-high-gravity ethanol fermentation with self-flocculating yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 84, n. 6, p. 1079-1086, May 2009.

LI, J.; WONG, L. Emerging patterns and gene expression data. **Genome Informatics**, Ohio, v. 12, n. 4, p. 3-13, Apr. 2001.

LI, L.; YE, Y.; PAN, L.; ZHU, Y.; ZHENG, S.; LIN, Y. The induction of trehalose and glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* in response to various stresses. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 387, n. 4, p. 778-783, Oct. 2009.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E.A. The heat-shock proteins. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 22, n. 10, p. 631-677, Dec. 1988.

LOCKHART, D.J.; DONG, H.; BYRNE, M.C.; FOLLETTIE, M.T.; GALLO, M.V.; CHEE, M.S.; MITTMANN, M.; WANG, C.; KOBAYASHI, M.; HORTON, H. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. **Nature Biotechnology**, New York, v. 14, n. 209, p. 1675–1680, Nov. 1996.

LUDWIG, K.M.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, D.F. Quantificação da floculação de *S. cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 63-68, Apr. 2001.

MAGER, W.H.; SIDERIUS, M. Novel insights into the osmotic stress response of yeast. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 2, n. 3, p. 251-257, Jan. 2002.

MAIORELLA, B.L.; BLANCH, H.W.; WILKE, C.R. Advances in biochemical engineering/ Biotechnology. **Spring Verlag**, Heildeberg, v. 20, n. 10, p. 41-73, Apr. 1981.

MANSURE, J.J.; SOUZA, R.C.; PANEK, A.D. Trehalose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 19, n. 12, p. 1201-1203, Dec. 1997.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - **Culturas/Cana-de-açúcar**. Disponível em: <www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-açúcar> Acesso em: 04 fev. 2014.

MENSONIDES, F.I.C.; SCHUURMANS, J.M.; MATTOS, M.J.T.; HELLINGWERF, K.J.; BRUL, S. The metabolic response of *Saccharomyces cerevisiae* to continuous heat stress. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 29, n. 1, p. 103-106, Jan. 2002.

MEYERS, B.C.; GALBRAITH, D.W.; NELSON, T.; AGRAWAL, V. Methods for Transcriptional Profiling in Plants. Be Fruitful and Replicate. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 135, n. 2, p. 637-652, Jun. 2004.

MIKKILINENI, V.; MITRA, R.D.; MERRITT, J.; DITONNO, J.R.; CHURCH, G.M.; OGUNNAIKE, B.; EDWARDS, J.S. Digital quantitative measurements of gene expression. **Biotechnology and Bioenergy**, Oslo, v. 86, n. 2, p. 117-124, Apr. 2004.

MITRA, R.D.; SHENDURE, J.; OLEJNIK, J.; EDYTA, K.O.; CHURCH, G.M. Fluorescent in situ sequencing on polymerase colonies. **Analytical of Biochemistry**, New York, v. 320, n. 1, p. 55-65, Sept. 2003.

MOREIRA, J.R, GOLDEMBERG, J. The Alcohol Program. **Energy Policy**, Guildford, v. 27, n. 4, p. 229-245, Apr. 1999.

MULDER, N.J.; APWEILER R.; ATTWOOD, T.K.; BAIROCH, A.; BATEMAN, A.; BINNS, D.; BRADLEY, P.; BORK, P.; BUCHER, P.; CERUTTI, L.; COPLEY, R.; COURCELLE, E.; DAS, U.; DURBIN, R.; FLEISCHMANN, W.; GOUGH, J.; HAFT, D.; HARTE, N.; HULO, N.; KAHN, D.; KANAPIN, A.; KRESTYANINOVA, M.; LONSDALE, D.; LOPEZ, R.; LETUNIC, I.; MADERA, M.; MASLEN, J.; MCDOWALL, J.; MITCHELL, A.; NIKOLSKAYA, A.N.; ORCHARD, S.; PAGNI, M.; PONTING, C.P.; QUEVILLON, E.; SELENGUT, J.; SIGRIST, C.J.A.; SILVENTOINEN, V.; STUDHOLME, D.J.; VAUGHAN, R.; WU, C.H. InterPro: progress and status in 2005. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 201-205, Jan. 2005.

NARENDRANATH, N.V.; POWER, R. Relationship between pH and medium dissolved solids in terms of growth and metabolism of lactobacilli and *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 5, p. 2239-2243, May 2005.

NEDER, R.N. **Contribuição ao estudo de algumas leveduras regionais de fábricas de aguardente de cana: posição sistemática e valor industrial**. 1957. 79p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1957.

NIELSEN, H.B.; WERNERSSON, R.; KNUDSEN, S. Design of oligonucleotides for microarrays and perspectives for design of multi-transcriptome arrays. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 31, n. 13, p. 3491-3496, Apr. 2003.

NISSSEN, T.L.; KIELLAND-BRANDT, M.C.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. Optimization of ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering of the ammonium assimilation. **Metabolic Engineering**, New York, v. 2, n. 1, p. 69-77, Jan. 2000.

_____; HAMANN, C.W.; KIELLAND-BRANDT, M.C.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. Anaerobic and aerobic batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae* mutants impaired in glycerol synthesis. **Yeast**, Davis, v. 16, n. 5, p. 463-474, Apr. 2000.

OHGREN, K.; RUDOLF, A.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Fuel ethanol production from steam-pretreated corn stover using SSF at higher dry matter content. **Biomass and Bioenergy**, New York, v. 30, n. 10, p. 863-869, Oct. 2006.

OONO, Y.; SEKI, M.; NANJO, T.; NARUSAKA, M.; FUGITA, M.; SATOH, R.; SATOU, M.; SAKURAI, T.; ISHIDA, J.; AKIYAMA, K.; IIDA, K.; MARUYAMA, K. E SATOH, S. Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* gene expression during rehydration process after dehydration using ca. 7000 full-length cDNA microarray. **The Plant Journal**, Oxford, v. 34, n. 6, p. 868-887, Jun. 2003.

ORIJ, R.; BRUL, S.; SMITS, G.J. Intracellular pH is a tightly controlled signal in yeast. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1810, n. 10, p. 933-944, Oct. 2011.

ORTIZ-ZAMORA, O.; CORTÉS-GARCÍA, R.; RAMÍREZ-LEPE, M.; GÓMEZ-RODRÍGUEZ, J.; AGUILAR-USCANGA, M. G. Isolation and selection of ethanol-resistant and osmotolerant yeasts from regional agricultural sources in Mexico. **Journal of Food Process Engineering**, Westport, v. 32, n. 5, p. 775-786, Oct. 2009.

OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 64, n. 1, p. 34-50, Mar. 2000.

OURA, E. Reaction products of yeast fermentations. **Process Biochemistry**, Rickmansworth, v. 12, n. 1, p.19-35, Aug. 1977.

PACHECO, T.F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. 2010. 94 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

formation in very high ethanol performance fed-batch process. **Microbial Cell Factories**, London, v. 9, n. 36, p. 1-13, Aug. 2010.

PARMAR, J.H.; BHARTIYA, S.; VENKATESH, K.V. Characterization of the adaptative response and growth upon hyperosmotic shock in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular BioSystems**, Cambridge, v. 7, n. 1, p. 1138-1148, Jan. 2011.

PARROU, J.L.; ENJALBERT, B.; PLOURDE, L.; BAUCHE, A.; GONZALEZ, B.; FRANÇOIS, J. Dynamic responses of reserve carbohydrate metabolism under carbon and nitrogen limitations in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, Davis, v. 15, n. 3, p. 191-203, Feb.1999.

PELCZAR, J.R.; ; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2.ed. São Paulo: Makron Books, 1997. 1324p.

PEREIRA, F.B.; GUIMARÃES, P.M.R.; TEIXEIRA, J.A.; DOMINGUES, L. Selection of *Saccharomyces cerevisiae* strains for efficient very high gravity bio-ethanol fermentation processes. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 32, n. 11, p. 1655-1661, Nov. 2010.

_____.; GUIMARÃES, P.M.R.; TEIXEIRA, J.A.; DOMINGUES, L. Robust industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for very high gravity bio-ethanol fermentations. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 112, n. 2, p. 130-136, Aug. 2011.

PIDDOCKE, M.P.; KREISZ, S.; HELDT-HANSEN, H.P; NIELSEN, K.F.; OLSSON, L. Physiological characterization of brewer's yeast in high-gravity beer fermentations with glucose or maltose syrups as adjuncts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 83, n. 3, p. 453-464, Sept. 2009.

PIPER, P.W. Molecular events associated with acquisition of heat tolerance by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 11, n. 4, p. 339- 356, Aug. 1993.

_____. The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 134, n. 2, p. 121-127, Dec. 1995.

ROCHA, J.; BUCKERIDGE, M. Biofuelling the future. **New Scientist**, London, v. 202, n. 2709, p. 26-26, May 2009.

RODRIGUES, M.I.; ANDRIETTA, M.G.S. **Controle da fermentação alcoólica através de testes microbiológicos e bioquímicas**. Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP, 1995. 54p. Apostila.

RODRIGUES, M.L; ANDRIETTA, S.R; MAUGERI, F.F. Simulação da produtividade e rendimento em fermentação alcoólica contínua, para reatores em fermentação alcoólica contínua, para reatores operando em condições ideais e não ideais de mistura. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 10, n. 5, p. 35-47, May 1992.

ROMAN, H. Development of yeast as an experimental organisms. **The molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae***, New York, v. 1, n. 1, p. 1-9, Apr. 1981.

ROTHMAN-DENES, L.B.; CABIB, E. Two forms of yeast glycogen synthetase and their role in glycogen accumulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 66, n. 3, p. 967-974, Jul. 1970.

RUAN, Y., GILMORE, J., CONNER, T. Towards *Arabidopsis* genome analysis: monitoring expression profiles of 1400 genes using cDNA microarrays. **The Plant Journal**, Oxford, v. 15, n. 6, p. 821-833, Sept. 1998.

SAITO, R.; SMOOT, M.E.; ONO, K.; RUSCHEINSKI, J.; WANG, P.L.; LOTIA, S.; PICO, A.R.; BADER, G.D.; IDEKER, T. A travel guide to Cytoscape plugins. **Nature Methods**, New York, v. 9, n. 11, p. 1069-1076. Nov. 2012.

SALGUEIRO, S.P; SÁ-CORREIA, I.; NOVAIS, J.M. Ethanol-induced leakage in *Saccharomyces cerevisiae*: kinetics and relationship to yeast ethanol tolerance and

alcohol fermentation productivity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 4, p. 903-909, Apr. 1988.

SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R.W.; BROWN, P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, Washington, v. 270, n. 5235, p. 467-470, Oct. 1995.

_____. Genome analysis with gene expression microarrays. **BioEssays**, Cambridge, v. 18, n. 5, p. 427-431, May 1996.

SCHLICKER, A.; DOMINGUES, F.S.; RAHNENFÜHRER, J.; LENGAUER, T. A new measure for functional similarity of gene products based on Gene Ontology. **BMC Bioinformatics**, London, v. 7, n. 1, p. 295-302, Jun. 2006.

SERÔDIO, E.A. **produção de açúcar e álcool durante o período do PROÁLCOOL**. 1.ed. Belo Horizonte: Brasiliense, 1995. 386p.

SHANNON, P.; MARKIEL, A.; OZIER, O.; BALIGA, N.S.; WANG, J.T.; RAMAGE, D.; AMIN, N.; SCHWIKOWSKI, B.; IDEKER, T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 13, n. 11, p. 2498-2504, Aug. 2003.

SHI, L.; SUTTER, B.M.; YE, X.; TU, B.P. Trehalose is a key determinant of the quiescent metabolic state that fuels cell cycle progression upon return to growth. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 21, n. 12, p. 1982-1990, Apr. 2010.

SILLJÉ, H.H.W.; PAALMAN, J.W.G.; SCHURE, E.G.; OLSTHOORN, S.Q.B.; VERKLEIJ, A.J.; BOONSTRA, J.; VERRIPS, C.T. Function of trehalose and glycogen in cell cycle progression and cell viability in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 181, n. 2, p. 396-400, Jan. 1999.

SIMILLION, C.; VANDEPOELE, K.; VAN MONTAGU, M.C.; ZABEAU, M.; VAN DE PEER, Y. The hidden duplication past of *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 99, n. 21, p. 13627-13631, Oct. 2002.

SIQUEIRA, P.F.; KARP, S.G.; CARVALHO, J.C.; STURM, W.; RODRIGUEZ-LEON, J.A.; THOLOZAN, J.L.; SINGHANIA, R.R.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**, New York, v. 99, n. 17, p. 8156-8163, Nov. 2008.

SMOOT, M.E.; ONO, K.; RUSCHEINSKI, J.; WANG, P.L.; Ideker, T. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. **Bioinformatics**, Oxford, v. 27, n. 3, p. 431-432, Feb. 2011.

SMYTH, G.K. Linear Models and Empirical Bayes Methods for Assessing Differential Expression in Microarray Experiments. **Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology**, Berkeley, v. 3, n. 1, p. 5999-6115, Feb. 2004.

STANLEY, D.; FRASER, S.; CHAMBERS, P.J.; ROGERS, P.; STANLEY, G.A. Generation and characterization of stable ethanol-tolerant mutants of

Saccharomyces cerevisiae. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 37, n. 2, p. 139-149, Feb. 2010.

SUPEK, F.; BOSNJAK, M.; ŠKUNCA, N.; ŠMUC, T. REVIGO summarizes and visualizes long lists of Gene Ontology terms. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 7, p. 111-121, Jul. 2011.

TAGA, T.; SENMA, M.; OSAKI, K. The Crystal and Molecular Structure of Trehalose Dihydrate. *Acta Crystallographica Section B: Structural crystallography and crystal chemistry*, Copenhagen, v. 28, n. 11, p. 3258-3263, Nov. 1972.

TALLA, E.; TEKAIA, F.; BRINO, L.; DUJON, B. A novel design of whole-genome microarray probes for *Saccharomyces cerevisiae* which minimizes cross-hybridization. **BMC Genomics**, London, v. 4, n. 38, p. 1471-1475, Sept. 2003.

TAURINHO, O.; FERREIRA, A.F.; PIMENTEL, L.R.F. Agricultura e Produção de Energia: Um Modelo de Programação Linear para Avaliação do PROÁLCOOL. **Pesquisa e Planejamento Econômico**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 1, p. 1-15, Apr. 1987.

THOMAS, K.C.; HYNES, S.H.; INGLEDEW, W.M. Effect of particulate materials and osmoprotectants on very-high-gravity ethanolic fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 5, p. 1519-1524, May 1994.

_____; HYNES, S.H.; INGLEDEW, W.M. Practical and theoretical considerations in the production of high concentrations of alcohol by fermentation. **Process Biochemistry**, London, v. 31, n. 4, p. 321-331, May 1996.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiology**. 8.ed. Berkeley: Artmed, 2008. 920 p.

_____. **on. The Biochemical Journal**, London, v. 62, n. 2, p. 177-183, May 1956.

UNICA, União da Indústria de cana-de-açúcar - **Dados de produção**. Disponível em: <www.unicadata.com.br> Acesso em: 17 abr. 2014.

VANEGAS, J.M.; CONTRERAS, M.F.; FALLER, R.; LONGO, M.L. Role of unsaturated lipid and ergosterol in ethanol tolerance of model yeast biomembranes. **Biophysical Journal**, New York, v. 102, n. 3, p. 507-516, Feb. 2012.

VISION, T.J.; BROWN, D.G.; TANKSLEY, S.D. The origins of genomic duplications in *Arabidopsis*. **Science**, Washington, v. 290, n. 5499, p. 2114-2117, Dec. 2000.

WALKER, G.M. **Yeast physiology and biotechnology**. 1.ed. Chichester: John-Wiley, 1998. 350 p.

WALKER-CAPRIOGLIO, H.M.; CASEY, W.M.; PARKS, L.W. *Saccharomyces cerevisiae* membrane sterol modifications in response to growth in the presence of ethanol. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 9, p. 2853-2857, Sept. 1990.

WANG, Z.X.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B.A. Glycerol production by microbial fermentation: a review. **Biotechnology Advances**, New York, v. 19, n. 3, p. 201-223, Jun. 2001.

WORTMAN, J.R.; HAAS, B.J.; HANNICK, L.I.; SMITH, R.K.; MAITI, R.; RONNING, C.M.; CHAN, A.P.; YU, C.; AYELE, M.; WHITELAW, C.A. Annotation of the Arabidopsis genome. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 132, n. 2, p. 461-468, Jun. 2003.

YAMADA, K.; LIM, J.; DALE, J.M.; CHEN, H.; SHINN, P.; PALM, C.J.; SOUTHWICK, A.M.; WU, H.C.; KIM, C.; NGUYEN, M. Empirical analysis of transcriptional activity in the Arabidopsis genome. **Science**, Washington, v. 302, n. 5646, p. 842-846, Oct. 2003.

YOU, K.M.; ROSENFELD, C.L.; KNIPPLE, D.C. Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 3, p. 1499-1503, Mar. 2003.

YUEN, T.; WURMBACH, E.; PFEFFER, R.L.; EBERSOLE, B.J.; SEALFON, S.C. Accuracy and calibration of commercial oligonucleotide and custom cDNA microarrays. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, n. 10, p. 47-48, Mar. 2002.

ZANIN, G.M.; SANT-ANA, C.C.; BOM, E.P.S.; GIORDANO, R.C.L.; MORAES, F.F.; ANDRIETTA, S.R.; CARVALHO, C.C.N.; MACEDO, LC.; FO, D.L.; RAMOS, LP.; FONTANA, J.D. Brazilian Bioethanol Program. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 84, n. 13, p.1147-1161, Aug. 2000.

ZARPELLON, F.; ANDRIETTA, A.S.R. Fermentação contínua para produção de álcool. **STAB Açúcar, Alcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 10, n. 4, p. 23-28, 1992.

ZHU, T.; WANG, X. Large-scale profiling of the Arabidopsis transcriptome. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 124, n. 4, p. 1472-1476, Dec. 2000.

ANEXOS

Anexo A – Os 50 genes induzidos com maiores valores de logFC para o experimento Exp. 0.6 dentre os 5860 identificados no experimento de microarranjo de DNA

Nome	logFC	Anotação
HDF2	6.25	KO: Subunidade da DNA Helicase 2 ATP-dependente. SGD: Subunidade do complexo telomérico.
YDR034W-B	5.83	KO: Proteína hipotética. SGD: Proteína ancorada por uma cauda à membrana plasmática (predição).
GSP2	5.44	KO: Proteína nuclear Ran (GTPase). KP: Biossíntese de ribossomos em Eucariotos. SGD: Teores da proteína aumentam em resposta a estresses na replicação do DNA.
YNK1	5.42	KO: Nucleosídeo difosfato quinase. KP: Metabolismo de purinas e pirimidinas. SGD: Teores da proteína aumentam em resposta a estresses na replicação do DNA.
YER053C-A	5.36	KO: Proteína hipotética. SGD: Teores da proteína aumentam em resposta a estresses na replicação do DNA.
RIM4	4.86	KO: Proteína hipotética. SGD: Proteína putativa com sítio de ligação a RNA.
HRK1	4.77	KO: Proteína com atividade quinase. SGD: Teores da proteína aumentam em resposta a estresses na replicação do DNA.
PBI2	4.65	KO: Proteína hipotética. SGD: Teores da proteína aumentam em resposta a estresses na replicação do DNA.
ASN1	4.65	KO: Asparagina Sintase (hidrólise de glutamina). KP: Metabolismo de Alanina, Aspartato e Glutamato. SGD: ASN1 possui o parâlogo ASN2.
CDA1	4.63	KO: Quitina deacetilase. KP: Metabolismo de açúcares amino e açúcares nucleotídeo. SGD: Envolvida na biossíntese de quitosano, componente da parede de ascósporos.
YHL048C-A	4.59	KO: Proteína hipotética.

(continua)

Anexo A – Os 50 genes induzidos com maiores valores de logFC para o experimento Exp. 0.6 dentre os 5860 identificados no experimento de microarranjo de DNA

(continuação)

Nome	logFC	Anotação
SPG1	4.54	KO: Proteína hipotética. SGD: Proteína necessária para sobrevivência em altas temperaturas durante a fase estacionária.
HMRA1	4.5	KO: Proteína <i>mating-type</i> A1. KP: Meiose - Leveduras. SGD: Correpessor <i>homeobox</i> que interage com Alpha2 para reprimir a transcrição de genes específicos em células diplóides.
YCL011C-A	4.45	KO: Proteína hipotética. SGD: YCL011C-A não é um gene essencial.
YDR003W-A	4.37	KO: Proteína hipotética.
YER138W-A	4.35	KO: Proteína hipotética. SGD: YER138W-A possui o parálogo YBL107W-A.
YCL001W-B	4.25	KO: Proteína hipotética. SGD: YCL001W-B possui o parálogo DOM34.
FMC1	4.24	KO: Fator de montagem da ATP sintase FMC1. SGD: Necessário para montar ou estabilizar a ATP sintase mitocondrial em altas temperaturas.
SUB1	4.21	KO: Proteína hipotética. SGD: Teores da proteína aumentam em resposta a estresses na replicação do DNA.
ROD1	4.21	KO: Proteína hipotética. SGD: Teores da proteína aumentam em resposta a estresses na replicação do DNA. ROD1 possui um parálogo, ROG3.
SPS100	4.2	KO: Proteína hipotética. SGD: Proteína necessária para a maturação da parede celular dos esporos. SPS100 possui um parálogo, YGP1.
YNL194C	4.19	KO: Proteína hipotética. SGD: Proteína integral de membrana. Necessária para o processo de esporulação.

Anexo A – Os 50 genes induzidos com maiores valores de logFC para o experimento Exp. 0.6 dentre os 5860 identificados no experimento de microarranjo de DNA

Nome	logFC	Anotação	(continuação)
YBL039W-A	4.16	KO: Proteína hipotética.	
YIL046W-A	4.16	KO: Proteína hipotética.	
YJL144W	4.16	KO: Proteína hipotética. SGD: Teores da proteína aumentam em resposta a estresses na replicação do DNA. Expressão é aumentada em condições de estresse osmótico, deficiência nutricional e durante a fase estacionária.	
SNC2	4.15	KO: Proteína de membrana associada a vesículas. KP: Transporte vesicular e interações SNARES. SGD: SNC2 possui o parálogo SNC1.	
FMP45	4.14	KO: Proteína hipotética. SGD: Proteína integral de membrana localizada nas mitocôndrias.	
MATALPHA2	4.12	KO: Proteína mating-type A2. KP: Meiose - Leveduras. SGD: Proteína com domínio Homeobox.	
YDR379C-A	4.09	KO: Proteína hipotética. SGD: Proteína envolvida na montagem do complexo succinato desidrogenase.	
RDH54	4.08	KO: Proteína de reparo de DNA. KP: Recombinação homóloga. SGD: Envolvida no reparo por recombinação da dupla fita de DNA durante os processos de mitose e meiose.	
ORF1	4.06	KO: Proteína hipotética. SGD: Proteína semelhante a maturases.	
CUE4	4.05	KO: Proteína hipotética. SGD: CUE4 possui um parálogo, CUE1.	
GSH2	4.03	KO: Glutaciona sintase. KP: Metabolismo de Glutaciona. SGD: Expressão induzida por estresse oxidativo e choque térmico.	
SPL2	3.96	KO: Proteína hipotética. SGD: Proteína similar a inibidores de quinase ciclina-dependentes.	

Anexo A – Os 50 genes induzidos com maiores valores de logFC para o experimento Exp. 0.6 dentre os 5860 identificados no experimento de microarranjo de DNA

Nome	logFC	Anotação
MFA1	3.95	KO: Feromônio Fator- <i>A mating</i> . KP: Via de sinalização MAPK – Leveduras. SGD: Também codificado por MFA2.
CPT1	3.95	KO: Colina fosfotransferase diacilglicerol. KP: Metabolismo de Glicerofosfolipídios. SGD: Necessária para biossíntese de fosfatidicolina e regulação da transcrição de EPT1. CPT1 possui o parálogo EPT1.
WHI3	3.95	KO: Proteína hipotética. SGD: Proteína com domínio de ligação ao RNA. WHI3 possui um parálogo, WHI4.
YGR153W	3.94	KO: Proteína hipotética.
LSM7	3.94	KO: Semelhante a proteínas que se associam a sn-RNAs. KP: Degradação de RNA e spliceossomo. SGD: Teores da proteína aumentam em resposta a estresses na replicação do DNA.
SHR5	3.93	KO: Subunidade da Palmitoil transferase. SGD: Palmitoil transferase é composta por SHR5 e ERF2.
HMLALPHA2	3.92	KO: Proteína <i>mating-type A2</i> . KP: Meiose - Leveduras. SGD: Proteína com domínio Homeobox.
SOL1	3.91	KO: 6-fosfogliconolactonase. SGD: Teores da proteína aumentam em resposta a estresses na replicação do DNA. SOL1 possui o parálogo SOL2.
YDL114W	3.9	KO: Proteína hipotética. SGD: Proteína putativa de cadeia curta com atividade desidrogenase/reductase.
YCR108C	3.89	KO: Proteína hipotética.
SCEI	3.86	SGD: Endonuclease I-Scel de DNA. Codificada pelo grupo mitocondrial intron I do gene 21S_rRNA.
YBL100W-C	3.86	KO: Proteína hipotética.

(continuação)

Anexo A – Os 50 genes induzidos com maiores valores de logFC para o experimento Exp. 0.6 dentre os 5860 identificados no experimento de microarranjo de DNA

Nome	logFC	Anotação	(conclusão)
THI4	3.86	KO: Tiamina/Tiazol sintase. KP: Metabolismo de Tiamina. SGD: Necessária para estabilidade do genoma mitocondrial sob condições de estresse.	
NAB3	3.86	KO: Proteína nuclear de ligação a RNA poliadenilado. SGD: Importante na formação da extremidade 3' em algumas moléculas de mRNAs, snRNAs, snoRNAs e CUTs.	
ADH1	3.85	KO: Álcool desidrogenase. KP: Glycolysis / Gluconeogenesis. SGD: Necessária para a redução de acetaldéido a etanol, última etapa da via glicolítica.	
YBR201C-A	3.84	KO: Proteína hipotética.	

*KO: KEGG Orthology; KP: KEGG Pathway; SGD: Saccharomyces Genome Database

Anexo B – Os 50 genes induzidos com maiores valores de logFC para o experimento Exp. 0.12 dentre os 5860 identificados no experimento de microarranjo de DNA

(continua)

Nome	logFC	Anotação
NTE1	4.35	KO: Lisofosfolipídio hidrolase. KP: Metabolismo de Glicerofosfolipídios. SGD: Serina esterase.
TDH3	4.31	KO: Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. KP: Glicólise / Gluconeogênese. SGD: TDH3 possui um parálogo, TDH2.
FRD1	4.2	KO: Fumarato redutase solúvel. SGD: Teores da proteína aumentam em resposta a estresses na replicação do DNA. FRD1 possui um parálogo, OSM1.
AAC3	4.13	KO: Adenina nucleotídeo translocase. SGD: Translocador de ADP/ATP presente na membrana interna de mitocôndrias. AAC3 possui um parálogo, PET9.
ARI1	4.11	KO: Aldeído redutase dependente de NADPH. SGD: Utiliza substratos aromáticos e alifáticos. Membro da superfamília de desidrogenases/reductases de cadeia curta.
MCD1	3.95	KO: Subunidade SCC1 do complexo coesina. SGD: Necessária para coesão entre cromátides irmãos em mitose e meiose.
AI4	3.87	KO: Endonuclease I-Scell. SGD: Codificado pelo grupo móvel intron I presente no gene mitocondrial COX1.
ENO2	3.55	KO: Enolase. KP: Glicólise / Gluconeogênese. SGD: Uma fosfopiruvato hidratase. ENO2 tem um parálogo, ENO1.
BUD8	3.55	KO: Proteína hipotética. SGD: BUD8 tem um parálogo, BUD9.
TDH2	3.54	KO: Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. KP: Glicólise / Gluconeogênese. SGD: TDH2 possui um parálogo, TDH3.

Anexo B – Os 50 genes induzidos com maiores valores de logFC para o experimento Exp. 0.12 dentre os 5860 identificados no experimento de microarranjo de DNA

(continuação)

Nome	logFC	Anotação
YER034W	3.53	KO: Proteína hipotética. SGD: Teores da proteína aumentam em resposta a estresses na replicação do DNA.
YBR230W-A	3.49	KO: Proteína hipotética. SGD: YBR230W-A tem um parálogo, COQ8.
PSD1	3.49	KO: Fosfatidilserina descarboxilase. KP: Metabolismo de Glicerofosfolípidios. SGD: Fosfatidilserina descarboxilase presente na membrana interna de mitocôndrias.
DAN1	3.47	KO: Proteína hipotética. SGD: Manoproteína de parede celular. Expressa sob condições anaeróbicas, completamente reprimida durante crescimento aeróbico.
YAR028W	3.46	KO: Proteína hipotética. SGD: Proteína putativa integral de membrana.
YIL029C	3.46	KO: Proteína hipotética. SGD: YIL029C possui um parálogo, YPR071W.
RPS28B	3.43	KO: Proteína S28e presente na subunidade menor dos ribossomos. KP: Ribossomos SGD: RPS28B possui um parálogo, RPS28A.
ATP6	3.41	KO: Subunidade a da F-ATPase (transportador de prótons). KP: Fosforilação Oxidativa. SGD: Subunidade a do setor F0 da ATP Sintase mitocondrial F1F0.
MRI1	3.41	KO: metilioribose-1-fosfato isomerase. KP: Metabolismo de Cisteína e Metionina. SGD: Presente na via de salvamento de Metionina.
MET3	3.38	KO: Sulfato adenililtransferase. KP: Metabolismo de Purinas, Selenocomponentes e enxofre. SGD: Cataliza a primeira etapa da ativação intracelular de sulfato. Envolvida no metabolismo de Metionina.
MSN4	3.37	KO: Proteína MSN2/4 (dedo de zinco). KP: Via de sinalização MAPK - Leveduras. SGD: Proteína ativada em condições de estresse. Sob essas condições migra do citoplasma para o núcleo. Liga-se ao DNA induzindo a expressão de genes.

Anexo B – Os 50 genes induzidos com maiores valores de logFC para o experimento Exp. 0.12 dentre os 5860 identificados no experimento de microarranjo de DNA

Nome	logFC	Anotação	(continuação)
RFM1	3.37	KO: Proteína hipotética.	
AVO2	3.33	KO: Proteína hipotética.	
RNR2	3.3	KO: Subunidade M2 de ribonucleosídeo difosfato redutase. KP: Metabolismo de Purinas, Pirimidinas e Glutamina. SGD: Proteína envolvida na biossíntese de dNTPs.	
CRH1	3.29	KO: Proteína hipotética.	
AYR1	3.29	KO: Acil glicerol fosfato redutase. KP: Metabolismo de Glicerolípídios. SGD: Acil dihidroxiketona fosfato redutase dependente de NADPH envolvida na biossíntese de ácido fosfatídico.	
SWI6	3.29	KO: Proteína regulatória. KP: Via de sinalização MAPK - Leveduras. SGD: Atua na regulação da transcrição de genes envolvidos na transição G1/S.	
RED1	3.28	KO: Proteína RED1. KP: Meiose - Leveduras. SGD: Proteína presente em elementos axiais do complexo sinaptonêmico.	
NTC20	3.27	KO: Proteína hipotética. SGD: Membro do complexo dezoenove (NTC).	
ALK1	3.27	KO: Proteína hipotética. SGD: Proteína com atividade quinase.	
HXT1	3.27	KO: Transportador Simporte (açúcar : H ⁺). SGD: baixa afinidade com glicose. Membro da Major Facilitator Superfamily (MSF).	
DSL1	3.27	KO: Proteína hipotética. SGD: Proteína periférica de membrana necessária para do Golgi para ER.	
BI3	3.26	KO: Ubiquinol-citocromo-c redutase. Subunidade do complexo citocromo-b. KP: Fosforilação Oxidativa. SGD: Maturase mitocondrial de mRNA.	

Anexo B – Os 50 genes induzidos com maiores valores de logFC para o experimento Exp. 0.12 dentre os 5860 identificados no experimento de microarranjo de DNA

Nome	logFC	Anotação
BSC1	3.26	KO: Proteína hipotética.
YPL068C	3.25	KO: Proteína hipotética.
POF1	3.24	KO: Proteína hipotética. SGD: Nicotinamida mononucleotídeo-específica adenilil transferase (NMNAT).
RNR1	3.24	KO: Subunidade M1 de ribonucleosídeo difosfato redutase. KP: Metabolismo de Purinas, Pirimidinas e Glutaciona. SGD: Isoforma da subunidade maior da ribonucleosídeo difosfato redutase.
VMA2	3.24	KO: Proteína hipotética. SGD: Proteína necessária para realização da função V-ATPase vacuolar.
TEM1	3.23	KO: Proteína da super família Ras envolvida na etapa final da fase M (GTPase). KP: Ciclo celular - Leveduras. SGD: Envolvida na terminação da fase M.
ANB1	3.21	KO: Fator 5A de iniciação da tradução. SGD: Função associada ao início do processo traducional.
CK11	3.21	KO: Colina quinase. KP: Metabolismo de Glicerofosfolípidos. SGD: Cataliza a primeira etapa de biossíntese de fosfatidilcolina.
DIG1	3.21	KO: Down-regulator de crescimento invasivo. KP: Via de sinalização MAPK - Leveduras. SGD: Envolvido na regulação de genes relacionados ao crescimento invasivo de leveduras.
DCD1	3.19	KO: dCMP deaminase. KP: Metabolismo de Pirimidinas. SGD: Envolvida na biossíntese de dUMP e dTMP.
NRG2	3.18	KO: Proteína hipotética. SGD: Repressor Transcricional.
PDC6	3.18	KO: Piruvato descarboxilase. KP: Glicólise/Gliconeogênese. SGD: Descarboxilação de piruvato a acetaldeído. Envolvida no processo de catabolismo de aminoácidos.
YBR238C	3.17	KO: Proteína hipotética. SGD: Proteína de membrana mitocondrial.

(continuação)

Anexo B – Os 50 genes induzidos com maiores valores de logFC para o experimento Exp. 0.12 dentre os 5860 identificados no experimento de microarranjo de DNA

Nome	logFC	Anotação	(conclusão)
GZF3	3.16	KO : Proteína de ligação ao domínio GATA. SGD : Regulação negativa de genes envolvidos no catabolismo de nitrogênio.	
TMA22	3.16	KO : Proteína hipotética. SGD : Teores da proteína aumentam em resposta a estresses na replicação do DNA.	
COF1	3.16	KO : Cofilina. SGD : Envolvida na despolarização pH-dependente de filamentos de actina.	
HAP5	3.16	KO : Proteína hipotética. SGD : Subunidade do complexo de ligação ao domínio CCAAT.	

*KO: KEGG Orthology; KP: KEGG Pathway; SGD: Saccharomyces Genome Database

Anexo C – Os 50 genes induzidos com maiores valores de logFC para o experimento Exp. 0.18 dentre os 5860 identificados no experimento de microarranjo de DNA

(continua)

Nome	logFC	Anotação
YKU80	6.64	KO : Subunidade da DNA Helicase 2 ATP-dependente. SGD : Subunidade do complexo telomérico.
GSP2	5.59	KO : Proteína nuclear Ran (GTPase). KP : Biossíntese de ribossomos em Eucariotos. SGD : Teores da proteína aumentam em resposta a estresses na replicação do DNA.
YDR034W-B	5.41	KO : Proteína hipotética. SGD : Proteína ancorada por uma cauda à membrana plasmática (predição).
FMP45	5.2	KO : Proteína hipotética. SGD : Proteína integral de membrana localizada nas mitocôndrias.
YER053C-A	5.03	KO : Proteína hipotética. SGD : Teores da proteína aumentam em resposta a estresses na replicação do DNA.
HRK1	4.88	KO : Proteína com atividade quinase. SGD : Teores da proteína aumentam em resposta a estresses na replicação do DNA.
CUE4	4.75	KO : Proteína hipotética. SGD : CUE4 possui um parálogo, CUE1.
SPS100	4.48	KO : Proteína hipotética. SGD : Proteína necessária para a maturação da parede celular dos esporos. SPS100 possui um parálogo, YGP1.
SPL2	4.42	KO : Proteína hipotética. SGD : Proteína similar a inibidores de quinase ciclina-dependentes.
SPG1	4.41	KO : Proteína hipotética. SGD : Proteína necessária para sobrevivência em altas temperaturas durante a fase estacionária.
THI4	4.29	KO : Tiamina/Tiazol sintase. KP : Metabolismo de Tiamina. SGD : Necessária para estabilidade do genoma mitocondrial sob condições de estresse.
YBR182C-A	4.28	KO : Proteína hipotética.

Anexo C – Os 50 genes induzidos com maiores valores de logFC para o experimento Exp. 0.18 dentre os 5860 identificados no experimento de microarranjo de DNA

Nome	logFC	Anotação	(continuação)
GAT4	4.27	KO: Proteína hipotética. SGD: Proteína contém o motivo dedo zinco GAT4.	
CPT1	4.26	KO: Colina fosfotransferase diacilglicerol. KP: Metabolismo de Glicerofosfolípidios. SGD: Necessária para biossíntese de fosfatidicolina e regulação da transcrição de EPT1. CPT1 possui o parálogo EPT1.	
RIM4	4.23	KO: Proteína hipotética. SGD: Proteína putativa com sítio de ligação a RNA.	
YLR012C	4.19	KO: Proteína hipotética: SGD: YLR012C não é um gene essencial.	
PBI2	4.17	KO: Proteína hipotética. SGD: Teores da proteína aumentam em resposta a estresses na replicação do DNA.	
ADH1	4.17	KO: Álcool desidrogenase. KP: Glycolysis / Gluconeogenesis. SGD: Necessária para a redução de acetaldeído a etanol, última etapa da via glicolítica.	
SFC1	4.15	KO: Carreador de solutos. SGD: Presente na membrana interna de Mitocôndrias. Transportador de succinato-fumarato para o citoplasma.	
ROD1	4.15	KO: Proteína hipotética. SGD: Teores da proteína aumentam em resposta a estresses na replicação do DNA. ROD1 possui um parálogo, ROG3.	
YHL015W-A	4.13	KO: Proteína hipotética.	
YNK1	4.06	KO: Nucleosídeo difosfato quinase. KP: Metabolismo de purinas e pirimidinas. SGD: Teores da proteína aumentam em resposta a estresses na replicação do DNA.	
SNC2	4.06	KO: Proteína de membrana associada a vesículas. KP: Transporte vesicular e interações SNAREs. SGD: SNC2 possui o parálogo SNC1.	

Anexo C – Os 50 genes induzidos com maiores valores de logFC para o experimento Exp. 0.18 dentre os 5860 identificados no experimento de microarranjo de DNA

(continuação)

Nome	logFC	Anotação
YBL100W-C	4.05	KO: Proteína hipotética.
SUB1	4.05	KO: Proteína hipotética. SGD: Teores da proteína aumentam em resposta a estresses na replicação do DNA.
YGR126W	4.03	KO: Proteína hipotética.
ACS1	4	KO: Acetil-CoA Sintetase. KP: Metabolismo de Piruvato, Propanoato e Metano. SGD: Juntamente com ACS2, atua fornecendo Acetil-CoA para acetilação de histonas no núcleo.
YCL048W-A	4	KO: Proteína hipotética.
IRC10	3.96	KO: Proteína hipotética.
DIT2	3.94	KO: Monoxigenase inespecífica. KP: Degradação de ácidos graxos e Metabolismo de triptofano. SGD: Necessária para a produção de N, N-bisformil ditirosina (maturação da parede de esporos).
GSH2	3.92	KO: Glutationa sintase. KP: Metabolismo de Glutationa. SGD: Expressão induzida por estresse oxidativo e choque térmico.
FHN1	3.91	KO: Proteína hipotética. SGD: FHN1 possui um parálogo, NCE102.
WHI3	3.89	KO: Proteína hipotética. SGD: Proteína com domínio de ligação ao RNA. WHI3 possui um parálogo, WHI4.
SCE1	3.88	SGD: Endonuclease I-SceI de DNA. Codificada pelo grupo mitocondrial intron I do gene 21S_rRNA.
PRM5	3.83	KO: Proteína hipotética. SGD: PRM5 possui um parálogo, YNL058C.
YNL194C	3.83	KO: Proteína hipotética. SGD: Proteína integral de membrana. Necessária para o processo de esporulação.

Anexo C – Os 50 genes induzidos com maiores valores de logFC para o experimento Exp. 0.18 dentre os 5860 identificados no experimento de microarranjo de DNA

(continuação)

Nome	logFC	Anotação
RF C3	3.81	KO: Fator de replicação C 3/5. KP: Replicação de DNA, reparo por excisão e por incompatibilidade de bases. SGD: Proteína de ligação a DNA (ATPase). Presente no Citoplasma em condições de hipoxia.
LRO1	3.8	KO: Fosfolídeos: Diacilglicerol aciltransferase. KP: Metabolismo de Glicerolípídeos. SGD: Uma das várias aciltransferases que contribuem na biossíntese de triglicerídeos.
NCE102	3.8	KO: Proteína hipotética. SGD: Possui domínios transmembrana. NCE102 possui um parálogo, FHN1.
AVO2	3.78	KO: Proteína hipotética. SGD: Possível papel na regulação do ciclo celular.
PAP2	3.78	KO: Não canônica poli (A) RNA polimerase PAPD5/7. KP: Degradação de RNA. SGD: Envolvida em processos de degradação de RNA no núcleo. Cataliza a poliadenilação de tRNA hipomodificados e precursores de snoRNAs e RRNAs.
YIL046W-A	3.77	KO: Proteína hipotética.
YJL144W	3.77	KO: Proteína hipotética. SGD: Teores da proteína aumentam em resposta a estresses na replicação do DNA. Expressão é aumentada em condições de estresse osmótico, deficiência nutricional e durante a fase estacionária.
YBR284W	3.76	KO: Proteína hipotética. SGD: Proteína putativa membro da superfamília de hidrolases metalo-dependentes.
CYC1	3.76	KO: Citocromo c. KP: Metabolismo de enxofre. SGD: Carreador de elétrons presente no espaço intermembrana em Mitocôndrias. CYC1 possui um parálogo, CYC7.
YCL001W-A	3.75	KO: Proteína hipotética.
SHR5	3.75	KO: Subunidade da Palmitoil transferase. SGD: Palmitoil transferase é composta por SHR5 e ERF2.
YNL195C	3.74	KO: Proteína hipotética. SGD: YNL195C possui um parálogo, HBT1.

Anexo C – Os 50 genes induzidos com maiores valores de logFC para o experimento Exp. 0.18 dentre os 5860 identificados no experimento de microarranjo de DNA

(conclusão)		
Nome	logFC	Anotação
FUS3	3.73	KO : Proteína quinase ativada por mitógeno 1/3. KP : Via de sinalização MAPK - Leveduras. SGD : Proteína quinase serina/treonina envolvida em <i>matíng</i> .
YDL114W	3.73	KO : Proteína hipotética. SGD : Proteína putativa de cadeia curta com atividade desidrogenase/redutase.

*KO: KEGG Orthology; KP: KEGG Pathway; SGD: Saccharomyces Genome Database

Anexo D – Descrição dos genes presentes em cada um dos perfis transcricionais apontados nesse trabalho e suas respectivas vias metabólicas

(continua)

Gene	Via Metabólica	Perfil Transcricional
LAT1	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Up/Down/Up</i>
YMR099C	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Up/Down/Up</i>
ERR3	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Up/Down/Up</i>
ERR2	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Up/Down/Up</i>
ADH3	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Up/Down/Up</i>
PGM2	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Up/Down/Up</i>
ERR1	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Up/Down/Up</i>
ADH6	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Up/Down/Up</i>
SFA1	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Up/Down/Up</i>
HXK1	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Up/Down/Up</i>
PDC5	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Up/Down/Up</i>
ALD6	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Up/Down/Up</i>
ALD2	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Up/Down/Up</i>
ACS2	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Up/Down/Up</i>
ADH1	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Up/Down/Up</i>
ACS1	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Up/Down/Up</i>
PGU1	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Up/Down/Up</i>
NTH2	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Up/Down/Up</i>
GSY1	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Up/Down/Up</i>
PGM2	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Up/Down/Up</i>
IMA4	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Up/Down/Up</i>
IMA3	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Up/Down/Up</i>
IMA2	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Up/Down/Up</i>
TPS1	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Up/Down/Up</i>
GSC2	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Up/Down/Up</i>
HXK1	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Up/Down/Up</i>
GLC3	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Up/Down/Up</i>
GSY2	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Up/Down/Up</i>
NTH1	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Up/Down/Up</i>
BGL2	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Up/Down/Up</i>
SGA1	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Up/Down/Up</i>
ATH1	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Up/Down/Up</i>
SUC2	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Up/Down/Up</i>
TPS2	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Up/Down/Up</i>
FKS1	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Up/Down/Up</i>
PGM2	Metabolismo de de Galactose	<i>Up/Down/Up</i>
IMA4	Metabolismo de de Galactose	<i>Up/Down/Up</i>
IMA3	Metabolismo de de Galactose	<i>Up/Down/Up</i>

Anexo D – Descrição dos genes presentes em cada um dos perfis transcricionais apontados nesse trabalho e suas respectivas vias metabólicas

(continuação)		
Gene	Via Metabólica	Perfil Transcricional
IMA2	Metabolismo de de Galactose	<i>Up/Down/Up</i>
HXK1	Metabolismo de de Galactose	<i>Up/Down/Up</i>
SUC2	Metabolismo de de Galactose	<i>Up/Down/Up</i>
SCT1	Metabolismo de Glicerolipídeos	<i>Up/Down/Up</i>
DAK2	Metabolismo de Glicerolipídeos	<i>Up/Down/Up</i>
DAK2	Metabolismo de Glicerolipídeos	<i>Up/Down/Up</i>
ALD6	Metabolismo de Glicerolipídeos	<i>Up/Down/Up</i>
DAK1	Metabolismo de Glicerolipídeos	<i>Up/Down/Up</i>
LRO1	Metabolismo de Glicerolipídeos	<i>Up/Down/Up</i>
TKL2	Pentose Fosfato	<i>Up/Down/Up</i>
NQM1	Pentose Fosfato	<i>Up/Down/Up</i>
PGM2	Pentose Fosfato	<i>Up/Down/Up</i>
SOL1	Pentose Fosfato	<i>Up/Down/Up</i>
PRS5	Pentose Fosfato	<i>Up/Down/Up</i>
YDR248C	Pentose Fosfato	<i>Up/Down/Up</i>
SOL4	Pentose Fosfato	<i>Up/Down/Up</i>
CHS2	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	<i>Up/Down/Up</i>
PGM2	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	<i>Up/Down/Up</i>
HXK1	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	<i>Up/Down/Up</i>
CHS3	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	<i>Up/Down/Up</i>
CDA2	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	<i>Up/Down/Up</i>
CDA1	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	<i>Up/Down/Up</i>
PFK26	Metabolismo de Frutose e Manose	<i>Up/Down/Up</i>
FBP26	Metabolismo de Frutose e Manose	<i>Up/Down/Up</i>
YLR345W	Metabolismo de Frutose e Manose	<i>Up/Down/Up</i>
YNR073C	Metabolismo de Frutose e Manose	<i>Up/Down/Up</i>
DSF1	Metabolismo de Frutose e Manose	<i>Up/Down/Up</i>
HXK1	Metabolismo de Frutose e Manose	<i>Up/Down/Up</i>
AAD4	Metabolismo de Frutose e Manose	<i>Up/Down/Up</i>
YOR283W	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Down/Up/Up</i>
FBA1	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Down/Up/Up</i>
GLK1	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Down/Up/Up</i>
ADH7	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Down/Up/Up</i>
ADH5	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Down/Up/Up</i>
GLK1	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Down/Up/Up</i>

Anexo D – Descrição dos genes presentes em cada um dos perfis transcricionais apontados nesse trabalho e suas respectivas vias metabólicas

(continuação)		
Gene	Via Metabólica	Perfil Transcricional
TPS3	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Down/Up/Up</i>
MAL32	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Down/Up/Up</i>
MAL12	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Down/Up/Up</i>
GLK1	Metabolismo de de Galactose	<i>Down/Up/Up</i>
GAL3	Metabolismo de de Galactose	<i>Down/Up/Up</i>
MAL32	Metabolismo de de Galactose	<i>Down/Up/Up</i>
MAL12	Metabolismo de de Galactose	<i>Down/Up/Up</i>
PAH1	Metabolismo de Glicerolipídeos	<i>Down/Up/Up</i>
SLC1	Metabolismo de Glicerolipídeos	<i>Down/Up/Up</i>
ADH7	Metabolismo de Glicerolipídeos	<i>Down/Up/Up</i>
GUT1	Metabolismo de Glicerolipídeos	<i>Down/Up/Up</i>
FBA1	Pentose Fosfato	<i>Down/Up/Up</i>
ZWF1	Pentose Fosfato	<i>Down/Up/Up</i>
PMI40	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	<i>Down/Up/Up</i>
GLK1	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	<i>Down/Up/Up</i>
GAL3	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	<i>Down/Up/Up</i>
PMI40	Metabolismo de Frutose e Manose	<i>Down/Up/Up</i>
GLK1	Metabolismo de Frutose e Manose	<i>Down/Up/Up</i>
SOR1	Metabolismo de Frutose e Manose	<i>Down/Up/Up</i>
AAD6	Metabolismo de Frutose e Manose	<i>Down/Up/Up</i>
AAD10	Metabolismo de Frutose e Manose	<i>Down/Up/Up</i>
TGL2	Metabolismo de Glicerolipídeos	<i>Up/Up/Up</i>
ATG15	Metabolismo de Glicerolipídeos	<i>Up/Up/Up</i>
MCR1	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	<i>Up/Up/Up</i>
PFK2	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Down/Down/Up</i>
PYK2	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Down/Down/Up</i>
SHB17	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Down/Down/Up</i>
IRC15	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Down/Down/Up</i>
PRM15	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Down/Down/Up</i>
IMA5	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Down/Down/Up</i>
PRM15	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Down/Down/Up</i>
IMA1	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Down/Down/Up</i>
PFK2	Metabolismo de de Galactose	<i>Down/Down/Up</i>
IMA5	Metabolismo de de Galactose	<i>Down/Down/Up</i>
GAL1	Metabolismo de de Galactose	<i>Down/Down/Up</i>
PRM15	Metabolismo de de Galactose	<i>Down/Down/Up</i>

Anexo D – Descrição dos genes presentes em cada um dos perfis transcricionais apontados nesse trabalho e suas respectivas vias metabólicas

(continuação)		
Gene	Via Metabólica	Perfil Transcricional
IMA1	Metabolismo de de Galactose	<i>Down/Down/Up</i>
PFK2	Pentose Fosfato	<i>Down/Down/Up</i>
PRM15	Pentose Fosfato	<i>Down/Down/Up</i>
GAL1	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	<i>Down/Down/Up</i>
PSA1	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	<i>Down/Down/Up</i>
PRM15	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	<i>Down/Down/Up</i>
PFK2	Metabolismo de Frutose e Manose	<i>Down/Down/Up</i>
PSA1	Metabolismo de Frutose e Manose	<i>Down/Down/Up</i>
SOR2	Metabolismo de Frutose e Manose	<i>Down/Down/Up</i>
PDC1	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Up/Down/Down</i>
PGM1	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Up/Down/Down</i>
YHL012W	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Up/Down/Down</i>
GDB1	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Up/Down/Down</i>
SPR1	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Up/Down/Down</i>
PGM1	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Up/Down/Down</i>
YHL012W	Metabolismo de de Galactose	<i>Up/Down/Down</i>
PGM1	Metabolismo de de Galactose	<i>Up/Down/Down</i>
GND2	Pentose Fosfato	<i>Up/Down/Down</i>
PGM1	Pentose Fosfato	<i>Up/Down/Down</i>
YHL012W	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	<i>Up/Down/Down</i>
PGM1	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	<i>Up/Down/Down</i>
AAD14	Metabolismo de Frutose e Manose	<i>Up/Down/Down</i>
PCK1	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Down/Down/Down</i>
UGP1	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Down/Down/Down</i>
UGP1	Metabolismo de de Galactose	<i>Down/Down/Down</i>
PRS3	Pentose Fosfato	<i>Down/Down/Down</i>
UGP1	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	<i>Down/Down/Down</i>
LPD1	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Up/Up/Down</i>
TDH1	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Up/Up/Down</i>
GPM2	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Up/Up/Down</i>
TPI1	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Up/Up/Down</i>
ENO1	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Up/Up/Down</i>
PGI1	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Up/Up/Down</i>
CDC19	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Up/Up/Down</i>
EXG2	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Up/Up/Down</i>

Anexo D – Descrição dos genes presentes em cada um dos perfis transcricionais apontados nesse trabalho e suas respectivas vias metabólicas

(continuação)		
Gene	Via Metabólica	Perfil Transcricional
PGI1	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Up/Up/Down</i>
RBK1	Pentose Fosfato	<i>Up/Up/Down</i>
TKL1	Pentose Fosfato	<i>Up/Up/Down</i>
PGI1	Pentose Fosfato	<i>Up/Up/Down</i>
GNA1	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	<i>Up/Up/Down</i>
PGI1	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	<i>Up/Up/Down</i>
TPI1	Metabolismo de Frutose e Manose	<i>Up/Up/Down</i>
ALD5	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Down/Up/Down</i>
TDH2	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Down/Up/Down</i>
ENO2	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Down/Up/Down</i>
TDH3	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Down/Up/Down</i>
GPM3	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Down/Up/Down</i>
PGK1	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Down/Up/Down</i>
GPM1	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Down/Up/Down</i>
GAL10	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Down/Up/Down</i>
PDA1	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Down/Up/Down</i>
ALD3	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Down/Up/Down</i>
ADH4	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Down/Up/Down</i>
HXK2	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Down/Up/Down</i>
THI3	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Down/Up/Down</i>
ADH2	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Down/Up/Down</i>
PFK1	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Down/Up/Down</i>
PDB1	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Down/Up/Down</i>
ALD4	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Down/Up/Down</i>
PDC6	Glicólise/Gliconeogênese	<i>Down/Up/Down</i>
EXG1	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Down/Up/Down</i>
FKS3	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Down/Up/Down</i>
FLO11	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Down/Up/Down</i>
HXK2	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Down/Up/Down</i>
TSL1	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Down/Up/Down</i>
GPH1	Metabolismo de Amido e Sacarose	<i>Down/Up/Down</i>
GAL7	Metabolismo de Galactose	<i>Down/Up/Down</i>
GAL10	Metabolismo de Galactose	<i>Down/Up/Down</i>
HXK2	Metabolismo de Galactose	<i>Down/Up/Down</i>
PFK1	Metabolismo de Galactose	<i>Down/Up/Down</i>
ALD5	Metabolismo de Glicerolipídeos	<i>Down/Up/Down</i>
ALE1	Metabolismo de Glicerolipídeos	<i>Down/Up/Down</i>
HOR2	Metabolismo de Glicerolipídeos	<i>Down/Up/Down</i>

Anexo D – Descrição dos genes presentes em cada um dos perfis transcricionais apontados nesse trabalho e suas respectivas vias metabólicas

(continuação)		
Gene	Via Metabólica	Perfil Transcricional
GPP1	Metabolismo de Glicerolípídeos	<i>Down/Up/Down</i>
TGL4	Metabolismo de Glicerolípídeos	<i>Down/Up/Down</i>
GPT2	Metabolismo de Glicerolípídeos	<i>Down/Up/Down</i>
TGL3	Metabolismo de Glicerolípídeos	<i>Down/Up/Down</i>
TDA10	Metabolismo de Glicerolípídeos	<i>Down/Up/Down</i>
RKI1	Pentose Fosfato	<i>Down/Up/Down</i>
PRS4	Pentose Fosfato	<i>Down/Up/Down</i>
SOL3	Pentose Fosfato	<i>Down/Up/Down</i>
GND1	Pentose Fosfato	<i>Down/Up/Down</i>
RPE1	Pentose Fosfato	<i>Down/Up/Down</i>
PRS1	Pentose Fosfato	<i>Down/Up/Down</i>
TAL1	Pentose Fosfato	<i>Down/Up/Down</i>
PRS2	Pentose Fosfato	<i>Down/Up/Down</i>
PFK1	Pentose Fosfato	<i>Down/Up/Down</i>
SOL2	Pentose Fosfato	<i>Down/Up/Down</i>
GAL7	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	<i>Down/Up/Down</i>
	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	
GFA1	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	<i>Down/Up/Down</i>
	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	
QRI1	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	<i>Down/Up/Down</i>
	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	
CTS1	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	<i>Down/Up/Down</i>
	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	
CHS1	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	<i>Down/Up/Down</i>
	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	
GAL10	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	<i>Down/Up/Down</i>
	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	
CBR1	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	<i>Down/Up/Down</i>
	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	
PCM1	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	<i>Down/Up/Down</i>
	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	
HXK2	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	<i>Down/Up/Down</i>
	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	
SEC53	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	<i>Down/Up/Down</i>
	Metabolismo de Amino Açúcares e Nucleotídeo Açúcares	
CTS2	Metabolismo de Frutose e Manose	<i>Down/Up/Down</i>
AAD3	Metabolismo de Frutose e Manose	<i>Down/Up/Down</i>
HXK2	Metabolismo de Frutose e Manose	<i>Down/Up/Down</i>
SEC53	Metabolismo de Frutose e Manose	<i>Down/Up/Down</i>
PFK27	Metabolismo de Frutose e Manose	<i>Down/Up/Down</i>

Anexo D – Descrição dos genes presentes em cada um dos perfis transcricionais apontados nesse trabalho e suas respectivas vias metabólicas

(conclusão)		
Gene	Via Metabólica	Perfil Transcricional
PFK1	Metabolismo de Frutose e Manose	<i>Down/Up/Down</i>

Anexo E – Nomes dos genes e compostos presentes nas vias mapeadas nesse trabalho

(continua)

Composto	Nome
AAD10	Lisina-Histona N-Metiltransferase
AAD14	Aril-álcool desidrogenase putativa
AAD3	Aril-álcool desidrogenase putativa
AAD4	Aril-álcool desidrogenase putativa
AAD6	Aril-álcool desidrogenase putativa
ACS1	Acetil-CoA sintetase
ACS2	Acetil-CoA sintetase
ADH1	Álcool desidrogenase
ADH2	Álcool desidrogenase
ADH3	Álcool desidrogenase
ADH4	Álcool desidrogenase
ADH5	Álcool desidrogenase
ADH6	Álcool desidrogenase
ADH7	Álcool desidrogenase
ALD2	Aldeído desidrogenase
ALD3	Aldeído desidrogenase
ALD4	Aldeído desidrogenase
ALD5	Aldeído desidrogenase
ALD6	Aldeído desidrogenase
ALE1	Lisofosfolípídeo aciltransferase
ATG15	Lipase
ATH1	Trealase
BGL2	1,3 Beta-glicosidase
C00022	Piruvato
C00024	Acetil-CoA
C00029	UDP-glicose
C00031	Glicose
C00033	Acetato
C00036	Oxaloacetato
C00040	Acil-CoA
C00043	UDP-N-acetilglicosamina
C00052	UDP-galactose
C00068	Tiamina difosfato
C00074	Fosfoenolpiruvato
C00084	Acetaldeído
C00089	Sacarose
C00093	Glicerol 1-fosfato
C00095	Frutose
C00096	GDP-Manose
C00103	Glicose 1-fosfato
C00111	Dihidroxicetona Fosfato

Anexo E – Nomes dos genes e compostos presentes nas vias mapeadas nesse trabalho

(continuação)

Composto	Nome
C00116	Glicerol
C00117	Ribose 5-fosfato
C00118	Gliceraldeído 3-fosfato
C00119	5-Fosforribosil difosfato
C00121	Ribose
C00124	Galactose
C00140	N-acetil glicosamina
C00159	Manose
C00162	Ácido graxo
C00184	Dihidroxicetona
C00197	3-Fosfoglicerato
C00199	Ribose 5-fosfato
C00208	Maltose
C00221	Beta-glicose
C00231	Xilulose 5-fosfato
C00236	1,3 Bifosfoglicerato
C00257	Gliconato
C00258	Glicerato
C00267	Alfa Glicose
C00275	Manose 6-fosfato
C00279	Eritrose 4-fosfato
C00329	Glicosamina
C00333	Galacturonato
C00345	6-Fosfogliconato
C00352	Glicosamina 6-fosfato
C00357	N-acetil glicosamina 6-fosfato
C00369	Amido
C00392	Manitol
C00416	Fosfatidato
C00422	Triacilglicerol
C00446	Alfa Galactose 1-fosfato
C00461	Quitina
C00469	Etanol ("Ethanol")
C00470	Pectato
C00492	Rafinose
C00501	CDP-glicose
C00577	Gliceraldeído
C00620	Ribose 1-fosfato
C00631	2-Fosfoglicerato
C00636	Manose 1-fosfato
C00641	1,2 Diacilglicerol

Anexo E – Nomes dos genes e compostos presentes nas vias mapeadas nesse trabalho

(continuação)

Composto	Nome
C00665	Frutose 2,6-bifosfato
C00668	Alfa Galactose 6-fosfato
C00673	2-Deoxi ribose 5-fosfato
C00681	Lisofosfatidato
C00689	Trealose 6-fosfato
C00718	Amilose
C00721	Dextrina
C00734	Quitosano
C00794	Sorbitol
C00965	1,3 Betaglicano
C00973	Ciclomaltodextrina
C00996	Ferricitocromo b5
C00999	Ferrocitocromo b5
C01083	Alfa, alfa trealose
C01094	Frutose 1-fosfato
C01096	Sorbitol 6-fosfato
C01097	Tagatose 6-fosfato
C01172	Beta-glicose 6-fosfato
C01236	Glucono 1,5-lactona 6-fosfato
C01613	Estaquiose
C01674	Quitobiose
C01801	Deoxiribose
C01885	1-Acilglicerol
C02336	Beta Frutose
C02888	Sorbose 1-fosfato
C03785	Tagatose 1,6-bifosfato
C04501	N-acetil-alfa-glicosamina 1-fosfato
C05125	2-(alfa-hidroxietil)Tiamina difosfato
C05345	Beta Frutose 6-fosfato
C05378	Beta Frutose 1,6-bifosfato
C05382	Sedoheptulose 7-fosfato
C05402	Mebiliose
C05404	Maninotriose
C15972	Lipoamido-E
C15973	Dihidroxilipoamido-E
C16255	S-Acetildihidroxilipoamido-E
C16688	Sacarose 6-fosfato
CBR1	Citocromo b redutase
CDA1	Quitina deacetilase
CDA2	Quitina deacetilase
CDC19	Piruvato quinase

Anexo E – Nomes dos genes e compostos presentes nas vias mapeadas nesse trabalho

(continuação)

Composto	Nome
CHS1	Quitina sintase I
CHS2	Quitina sintase II
CHS3	Quitina sintase III
CTS1	Endoquitinase
CTS2	Quitinase Putativa
DAK1	Dihidroxiketona quinase
DAK2	Dihidroxiketona quinase
DSF1	Manitol 2-desidrogenase
ENO1	Enolase (fosfopiruvato hidratase)
ENO2	Enolase (fosfopiruvato hidratase)
ERR1	Enolase (fosfopiruvato hidratase)
ERR2	Enolase (fosfopiruvato hidratase)
ERR3	Enolase (fosfopiruvato hidratase)
EXG1	Exo 1,3 betaglucanase
EXG2	Exo 1,3 betaglucanase
FBA1	Frutose 1,6-bifosfato aldolase
FBP26	Frutose 2,6-bifosfatase
FKS1	Subunidade catalítica de 1,3 Beta-glucano sintase Proteína similar a subunidade catalítica de 1,3 Beta-glucano sintase
FKS3	Subunidade catalítica de 1,3 Beta-glucano sintase
FLO11	Glicoamilase
GAL1	Galactoquinase
GAL10	UDP-glicose 4-epimerase
GAL3	Galactoquinase
GAL7	UDPglicose--hexose-1-fosfato uridililtransferase
GDB1	Enzima de desramificação de glicogênio
GFA1	Glicosamina--Frutose-6-fosfato aminotransferase
GLC3	Enzima de ramificação de glicogênio
GLK1	Glucoquinase
GNA1	Glucosamina 6-fosfato acetiltransferase
GND1	6-fosfogluconato desidrogenase
GND2	6-fosfogluconato desidrogenase
GPH1	Glicogênio fosforilase
GPM1	Fosfoglicerato mutase
GPM2	Fosfoglicerato mutase
GPM3	Fosfoglicerato mutase
GPP1	Glicerol 3-fosfatase 1 Glicerol 3-fosfato o-aciltransferase/ dihidroxiketona fosfato aciltransferase
GPT2	fosfato aciltransferase
GSC2	Subunidade catalítica de 1,3 Beta-glucano sintase
GSY1	Glicogênio sintase

Anexo E – Nomes dos genes e compostos presentes nas vias mapeadas nesse trabalho

(continuação)

Composto	Nome
GSY2	Glicogênio sintase
GUT1	Glicerol quinase
HOR2	Glicerol 3-fosfatase 2
HXK1	Hexoquinase isoenzima 1
HXK2	Hexoquinase isoenzima 2
IMA1	Alfa glicosidase
IMA2	Alfa glicosidase
IMA3	Alfa glicosidase
IMA4	Alfa glicosidase
IMA5	Alfa glicosidase
IRC15	Dihidrolipoamida desidrogenase
LAT1	Dihidrolipoamida acetiltransferase
LPD1	Dihidrolipoamida desidrogenase
LRO1	Diacilglicerol aciltransferase
MAL12	Alfa Glicosidase
MAL32	Alfa Glicosidase
MCR1	Citocromo b5 redutase
NQM1	Transaldolase
NTH1	Alfa, alfa trealase
NTH2	Alfa, alfa trealase
PAH1	Fosfatidato fosfatase
PCK1	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PCM1	Fosfoacetilglucosamina Mutase
PDA1	Piruvato desidrogenase E1 subunidade alfa
PDB1	Piruvato desidrogenase E1 subunidade beta
PDC1	Piruvato descarboxilase
PDC5	Piruvato descarboxilase
PDC6	Piruvato descarboxilase
PFK1	6-fosfofrutoquinase
PFK2	6-fosfofrutoquinase
PFK26	6-fosfofruto-2-quinase
PFK27	6-fosfofruto-2-quinase
PGI1	Glicose-6-fosfato isomerase
PGK1	Fosfoglicerato quinase
PGM1	Fosfoglicomutase
PGM2	Fosfoglicomutase
PGU1	Poligacturonase
PMI40	Manose 6-fosfato isomerase
PRM15	Fosfoglicomutase
PRS1	Ribose-fosfato pirofosfoquinase
PRS2	Ribose-fosfato pirofosfoquinase

Anexo E – Nomes dos genes e compostos presentes nas vias mapeadas nesse trabalho

(continuação)

Composto	Nome
PRS3	Ribose-fosfato pirofosfoquinase
PRS4	Ribose-fosfato pirofosfoquinase
PRS5	Ribose-fosfato pirofosfoquinase
PSA1	Manose 1-fosfato guanililtransferase
PYK2	Piruvato quinase
QRI1	UDP-N-acetilglicosamina pirofosforilase
RBK1	Riboquinase
RKI1	Ribose 5-fosfato isomerase A
RPE1	Ribulose fosfato 3-epimerase
SCT1	Glicerol 3-fosfato o-aciltransferase/ dihidroxicetona fosfato aciltransferase
SEC53	Fosfomanomutase
SFA1	S-(hidroximetil) glutationa desidrogenase/ Álcool desidrogenase
SGA1	Glicoamilase
SHB17	Fosfoglicerato mutase putativa
SLC1	Lisofosfatidato aciltransferase
SOL1	6-fosfogliconolactonase
SOL2	6-fosfogliconolactonase
SOL3	6-fosfogliconolactonase
SOL4	6-fosfogliconolactonase
SOR1	L-iditol 2-desidrogenase
SOR2	L-iditol 2-desidrogenase
SPR1	1,3 Beta-glicosidase
SUC2	Beta frutofuranosidase
TAL1	Transaldolase
TDA10	Glicerato 3-quinase
TDH1	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
TDH2	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
TDH3	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
TGL2	Triacilglicerol lipase
TGL3	Triacilglicerol lipase
TGL4	Triacilglicerol lipase
THI3	Piruvato descarboxilase
TKL1	Transcetolase
TKL2	Transcetolase
TPI1	Triosefosfato isomerase (TIM)
TPS1	Trealose 6-fosfato sintase
TPS2	Trealose 6-fosfato sintase/fosfatase
TPS3	Trealose 6-fosfato sintase/fosfatase
TSL1	Trealose 6-fosfato sintase/fosfatase

Anexo E – Nomes dos genes e compostos presentes nas vias mapeadas nesse trabalho

(conclusão)

Composto	Nome
UGP1	UTP--glicose-1-fosfato uridililtransferase
YDR248C	Gliconoquinase
YHL012W	UTP--glicose-1-fosfato uridililtransferase
YLR345W	Frutose 2,6-bifosfatase
YMR099C	Glicose-6-fosfato 1-epimerase
YNR073C	Manitol 2-desidrogenase
YOR283W	Fosfoglicerato mutase putativa
ZWF1	Glicose-6-fosfato 1-desidrogenase